

ÜBER EINIGE REAKTIONSFÄHIGE HOCHPOLYMERE
UND IHRE UMSETZUNGSPRODUKTE
MIT PROTEINEN , PEPTIDEN UND ENZYMEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
G u d r u n G ü n z e l
aus Grünberg/Schlesien

1969

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e. V.

DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

ÜBER EINIGE REAKTIONSFÄHIGE HOCHPOLYMERE
UND IHRE UMSETZUNGSPRODUKTE
MIT PROTEINEN , PEPTIDEN UND ENZYMEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
G u d r u n G ü n z e l
aus Grünberg/Schlesien

1. Referent: Prof. Dr. G. Manecke
2. Referent: Prof. Dr. W. Broser



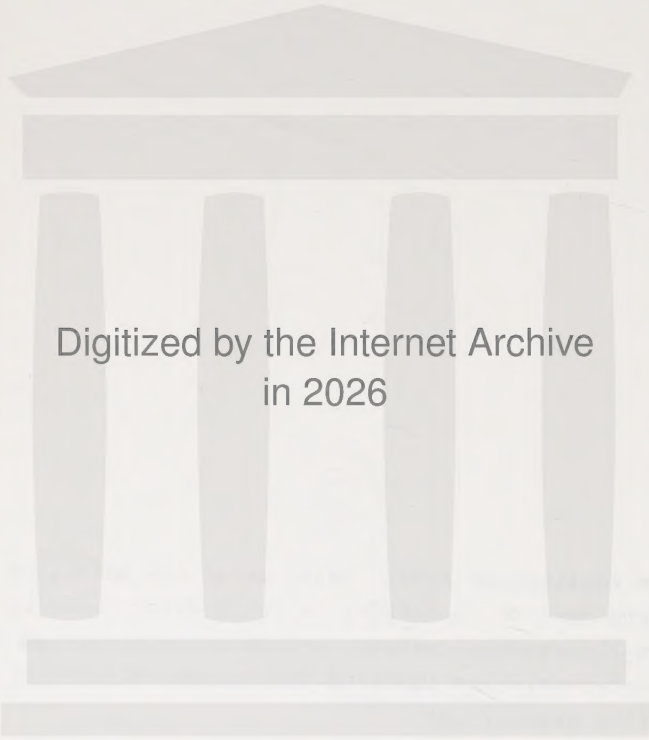
Tag der mündlichen Prüfung : 28. 10. 1968

Tag der Promotion :

14. FEB 1969

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof.Dr. G.MANECKE im Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft in Berlin-Dahlem und im Organisch-chemischen Institut der Freien Universität Berlin angefertigt.

Ich danke Herrn Prof.Dr. G.MANECKE für sein ständiges Interesse, viele wertvolle Anregungen und die mir in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung, wodurch diese Arbeit wesentlich gefördert wurde.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I n h a l t

1.	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2.	Spezieller Teil	5
2.1.	Untersuchung der Umsetzungsprodukte aus Enzymen und einem nitrierten Methacrylsäure/Methacrylsäure-m-fluoranilid Copolymerisat	5
2.1.1.	Die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität des Diastaseharzes	5
2.1.2.	Umsetzung des reaktionsfähigen Copolymerisates mit den Enzymen Cellulase, Leucinaminopeptidase, Trypsin, Papain und Dextranaccharase sowie die Untersuchung der Enzymharze	7
2.1.2.1.	Cellulaseharz	8
2.1.2.2.	Trypsinharz	11
2.1.2.3.	Papainharz	13
2.1.2.4.	Leucinaminopeptidaseharz	18
2.1.2.5.	Dextranaccharaseharz	19
2.2.	Nitrierte Copolymerisate aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid mit makroporöser Struktur	21
2.2.1.	Papainharze	24
2.3.	Reaktionsfähige Polymere mit Isothiocyanatgruppen	28
2.3.1.	m-Isothiocyanatostyrol-Copolymerisate	32
2.3.1.1.	Darstellung der Copolymerisate	32
2.3.1.2.	Umsetzung mit n-Butylamin und Leucinamid	37
2.3.1.3.	Umsetzung mit Di- und Tripeptiden	39
2.3.1.4.	Umsetzung mit Proteinen	42
2.3.1.5.	Umsetzung mit Papain	45
2.3.2.	Vinylisothiocyanat-Copolymerisate	50
2.3.3.	Polymere Isothiocyanate aus polymeren primären Aminen	54
2.3.3.1.	Polymere Isothiocyanate aus Lewatit CA 9119 und aus sulfoniertem Polyaminostyrol	55
2.3.3.2.	Polymere Isothiocyanate aus einem m-Aminostyrol-Methacrylsäure-Copolymerisat und aus Polyvinylamin	59

2.4.	Wasserunlösliches, vernetztes Papain	66
3.	Zusammenfassung	68
4.	Experimenteller Teil	72
5.	Literaturverzeichnis	96

1. Einleitung und Aufgabenstellung

In neuerer Zeit haben kovalent an Hochpolymere gebundene Peptide, Eiweiße und Enzyme immer stärkere Beachtung gefunden. Sowohl aus theoretischer Sicht als auch vom praktischen Standpunkt haben sie auf dem Gebiet der Peptidchemie der Immunologie sowie der Enzymologie neue Arbeitsmöglichkeiten eröffnet.

R.B. Merrifield (1) und R.L. Letsinger (2) beschrieben als erste die Möglichkeit, reaktionsfähige Hochpolymere erfolgreich als Trägersubstanz bei der Peptidsynthese einzusetzen. R.L. Laurensen (3) sowie A. Schellenberger und Mitarbeiter (4) beschrieben fast gleichzeitig den stufenweisen Abbau von an reaktionsfähige Hochpolymere gebundenen Peptiden. Für beide Verfahren ist die leichte Abtrennbarkeit der Reaktionsprodukte kennzeichnend.

Bei der Umsetzung geeigneter reaktionsfähiger Polymerer mit Antigenen und Antikörpern erhält man unlösliche serologisch spezifische Adsorbentien, die sich zur Isolierung und Anreicherung der entsprechenden Antikörper bzw. Antigene einsetzen lassen. So kann man z.B. mit Hilfe der Antigenharze aus Antiseren Antikörper rein gewinnen und isolieren. Darüberhinaus besitzen solche Antigen- und Antikörperharze auch theoretische Bedeutung als Modellsubstanzen bei Studien physiologischer Vorgänge (5,6,7).

Die Umsetzung von reaktionsfähigen Polymeren mit Enzymen führt unter Ausbildung kovalenter Bindungen vielfach zu wasserunlöslichen Polymeren mit Enzymaktivität, deren vielseitige Anwendungsmöglichkeiten heute noch gar nicht übersehen werden können.

Für die Umsetzung mit einem reaktionsfähigen Hochpolymeren stehen in den Enzymen folgende Gruppen

zur Verfügung:

freie Carboxylgruppen, freie Aminogruppen, phenolische OH-Gruppen, Sulfhydrylgruppen, die Imidazolgruppen des Histidins, die Indolgruppe des Tryptophans, die Guanidinstruktur im Arginin sowie die Säureamidgruppe im Glutamin.

Bisher wurden die Enzyme Trypsin (8-11), Chymotrypsin (8,12), Papain (13,14), Ficin (12), Pepsin (15,16), Carboxypeptidase (15), Streptokinase (17,18), Ribonuclease (8,9,12,15,19), Urease (20), Diastase (14,15, 16), Invertase (21) und Alkoholdehydrogenase (16) mit reaktionsfähigen Hochpolymeren umgesetzt.

Die zur Reaktion mit den Peptiden einzusetzenden Hochpolymeren müssen reaktionsfähige Gruppen aufweisen, die mit den genannten funktionellen Gruppen der Peptide reagieren können. Um zu Enzymharzen mit hoher Enzymaktivität zu gelangen, dürfen einerseits die reagierenden funktionellen Gruppen des Enzyms nicht essentiell für die Enzymaktivität sein, zum anderen müssen die Hochpolymeren befähigt sein, unter schonenden, für das Eiweiß nicht denaturierenden Bedingungen (wässriges Medium, niedrige Temperatur, pH-Wert nahe dem Neutralpunkt) zu reagieren. Des weiteren sollte das reaktionsfähige Hochpolymere vollständig wasserunlöslich aber benetzbar, zur Vergrößerung der Oberfläche möglichst quellbar und dabei gleichzeitig mechanisch stabil sein.

Diese aufgeführten, an ein reaktionsfähiges Hochpolymeres und das damit umzusetzende Enzym zu stellenden Anforderungen wurden bei den bisher bekanntgewordenen Enzymharzen nur teilweise erfüllt.

Bei dem Versuch, für die Umsetzung mit dem Enzym geeignete Hochpolymere darzustellen, wurden bisher zwei Wege beschritten:

1. Einführung von funktionellen Gruppen in natürlich vorkommende Polymere
2. Einführung von funktionellen Gruppen in synthetische Hochpolymere

Die weitere, naheliegende Möglichkeit, reaktionsfähige Monomere zu polymerisieren, ist bisher nicht ausgenutzt worden.

Als natürlich vorkommende hochmolekulare Verbindung wurde wegen ihrer Wasserunlöslichkeit bei gleichzeitig guter Benetzbarkeit häufig Cellulose benutzt. Die Hydroxylgruppen erlaubten die Einführung der verschiedensten reaktionsfähigen Gruppen, so daß folgende Cellulosederivate zur Umsetzung mit Proteinen eingesetzt wurden:

Carboxymethylcelluloseazid (8,9), diazotierter m-Aminobenzylloxymethyläther der Cellulose (22-26), diazotierte p-Aminobenzylcellulose (8,12,22,27-29), Bromacetylcellulose (10), und während der Durchführung dieser Arbeit ein mit Isothiocyanatgruppen modifiziertes Sephadex (30). Die vielfach beobachteten niedrigen Umsetzungsgrade bei der Darstellung der Cellulosederivate ließen bereits frühzeitig Versuche mit synthetischen Polymeren aussichtsreich erscheinen. So wurden z.B. Carbonsäure- und Sulfonsäurechloride (31) von Ionenaustauschern mit Proteinen umgesetzt. Ebenso wurden diazotiertes Polyaminostyrol (15,22,32-34), Polyisocyanatostyrol (35-37), und während der Durchführung dieser Arbeit auch Polyisothiocyanatostyrol (7) zur Reaktion eingesetzt. Einen etwas abweichenden Weg beschritten E. Katchalski und Mitarbeiter. Sie stellten eine "natürliche" Matrix durch Copolymerisation von Carbonsäureanhydriden des Leucins mit p-Amino-DL-phenylalanin dar und kuppelten über dessen Diazoniumsalz mit verschiedenen Enzymen (11,38).

Die Reaktionsfähigkeit des durch Substituenten zweiter Ordnung aktivierten aromatisch gebundenen Fluors wurde im Arbeitskreis um G. Manecke bei der Verwendung nitrierter Copolymerisate aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid (16,21,37) bzw. 2-, 3- oder 4-Fluorstyrol sowie 4'-Fluorphenylsulfone des Polystyrols (14) zur Umsetzung mit Proteinen und Enzymen ausgenutzt.

Die bisher erfolgreichen Arbeiten an einem nitrierten Copolymerisat aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid legten es nahe, dieses Copolymerisat und seine Umsetzungsprodukte mit Enzymen und Proteinen näher zu untersuchen, sowie die dabei gewonnenen Erkenntnisse für die Darstellung neuer enzymaktiver Hochpolymere zu verwenden.

Ausgehend von der Verwendung des Phenylisothiocyanates als Reagenz zur Bestimmung der Endgruppen in Peptiden nach Edman (39), sollte daher versucht werden, in Fortführung der oben genannten Untersuchungen reaktionsfähige Polymere mit Isothiocyanatgruppen darzustellen und ihre Reaktionsfähigkeit gegenüber Proteinen und Enzymen zu prüfen.

2. Spezieller Teil

2.1. Untersuchung der Umsetzungsprodukte aus Enzymen und einem nitrierten Methacrylsäure/Methacrylsäure-m-fluoranilid Copolymerisat

2.1.1. Die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität des Diastaseharzes

Y. Levin und Mitarbeiter (40) hatten bei ihren Arbeiten über Enzymharze gefunden, daß ein an einen polymeren Träger gebundenes Enzym gegenüber pH-Änderungen eine höhere Stabilität aufweist als das gleiche Enzym im gelösten Zustand. In Fortführung der schon an anderer Stelle beschriebenen Untersuchungen über nitrierte Copolymerisate aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid (16) wurde daher zunächst geprüft, ob ein bereits früher hergestelltes Diastaseharz (16) ein entsprechendes Verhalten erkennen läßt.

Bei den Aktivitätsänderungen von Enzymen unter dem Einfluß verschiedener H^+ -Ionenkonzentrationen muß zwischen der eigentlichen pH-Abhängigkeit des Aktivitätsmaximums und einer irreversiblen Denaturierung bei längerer Einwirkung saurer oder alkalischer Medien unterschieden werden. Der Grad der irreversiblen Denaturierung kann bestimmt werden, indem die Aktivitätsbestimmung nach der Einwirkung des sauren oder alkalischen Mediums bei dem für die Enzymaktivität optimalen pH-Wert gemessen wird. Diastase besitzt ein Maximum der Aktivität bei einem pH-Wert von 6,2. Unterhalb pH 3 und oberhalb pH 10 ist keine Aktivität mehr meßbar.

Für die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der gebundenen Diastase wurde das in $0,1n NaHCO_3$ -haltiger

gesättigter Diastaselösung umgesetzte nitrierte Copolymerisat aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid der Korngröße 0,1-0,2 mm Ø vorsichtig bei Zimmertemperatur getrocknet und in Proben von ca. 100 mg eingesetzt. Der Einfluß des pH-Wertes auf die Höhe der Aktivität wurde durch Veränderung des pH-Wertes des bei der Aktivitätsbestimmung nach R. Willstätter und Mitarbeiter (41) benutzten Puffers geprüft.

Für die Bestimmung der irreversiblen Denaturierung wurden Proben des bereits einige Zeit gelagerten und deshalb eine geringere Aktivität aufweisenden Enzymharzes einer 12stündigen Einwirkung von Pufferlösungen nach Theorell und Steinhagen (75) mit jeweils verschiedenen pH-Werten ausgesetzt. Anschließend wurden die Aktivitätsbestimmungen bei pH-6,2 durchgeführt. Hier wie auch bei allen nachfolgenden Untersuchungen wird als Versuchsergebnis das arithmetische Mittel aus den an zwei Harzeinwagen erhaltenen Werten angegeben.

Für beide Meßreihen wurden Vergleichswerte mit frisch gelöster Diastase ermittelt.

Tabelle 1 a

pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität des Diastaseharzes und der gelösten Diastase

pH x	mg gebildete Maltose bei pH x nach 30 Minuten bei 37°C	
	aus 0,5 mg gel. Diastase	aus 1g Diastase- harz
2,0	0,0	0,0
3,3	44,7	83,3
4,4	61,8	83,3
5,5	61,8	84,5
6,2	63,0	97,5
7,5	57,8	97,5
8,5	46,3	71,2
9,4	13,7	70,1
10,0	5,2	49,7

Tabelle 1 b

Bestimmung der irreversiblen Denaturierung der gelösten Diastase und des Diastaseharzes

12stündige Aufbewahrung bei pH	mg gebildete Maltose bei pH 6,2 nach 30 Minuten bei 37° C.	
	aus 0,5 mg gel. Diastase	aus 1 g Diastase- harz
3,3	46,3	35,0
4,4	49,5	47,7
5,5	49,7	47,5
6,2	53,2	51,7
7,5	48,0	47,0
8,3	49,0	47,4
9,4	22,3	43,8

Eine Verschiebung des Aktivitätsmaximums der gebundenen Diastase gegenüber dem gelösten Enzym ist bei diesem Enzymharz nicht festzustellen. Dagegen scheint das pH-Aktivitätsprofil der gebundenen Diastase in den alkalischen pH-Bereich verschoben zu sein.

Bezogen auf die Aktivitätswerte bei pH 6,2 zeigt die gelöste Diastase bei pH 9,4 22 % der Aktivität, während das Diastaseharz noch 72 % aufweist

(Tabelle 1 a). Ähnliche Relationen lassen sich bei der irreversiblen Denaturierung feststellen. Hier beträgt der Aktivitätsverlust des Enzymharzes bei pH 9,4 15,5 % gegenüber 58 % der gelösten Diastase, wenn auf den bei pH 6,2 gemessenen Aktivitätswert bezogen wird (Tabelle 1 b).

2.1.2. Umsetzung des reaktionsfähigen Copolymerisates mit den Enzymen Cellulase, Leucinaminopeptidase, Trypsin, Papain und Dextranase sowie die Untersuchung der Enzymharze

Wie bereits beschrieben, besitzt ein nitriertes Copolymerisat aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid (Molverhältnis 2:1) besonders günstige

Bindungseigenschaften gegenüber Enzymen wie Diastase, Pepsin und Alkoholdehydrogenase (16).

Zur näheren Untersuchung dieses reaktionsfähigen Copolymerisates wurde es mit weiteren Enzymen verschiedener Spezialität umgesetzt. Dazu wurde Cellulase als Carbohydase, Trypsin und Papain als Proteinasen, Leucinaminopeptidase als Peptidase und Dextranase als Synthesease ausgewählt. Es standen die Enzyme folgender Provenience zur Verfügung: Cellulase prakt., Papain prakt. und Peptidase der Firma Serva Heidelberg, Trypsin der Firma Merck und Dextranase von Herrn Prof. Patat freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Umsetzungen der Enzyme wurden in 0,1n NaHCO_3 -Lösung mit Harzproben der Korngröße 0,1-0,2 mm $\varnothing$ ausgeführt. Aus der Differenz des Eiweißgehaltes der zur Reaktion eingesetzten Enzymlösung und der nach der Umsetzung im Waschwasser verbliebenen Eiweißmenge wurde die an das Copolymerisat gebundene Enzymmenge bestimmt. Die Enzymaktivität der gewonnenen Enzymharze ließ sich nach den auf die speziellen Bedingungen der Reaktion in heterogener Phase abgewandelten üblichen Methoden der einzelnen Enzyme messen. Aussagen über die Beständigkeit der Enzymharze wurden durch wiederholte Umsetzung derselben Harzproben mit dem Substrat gewonnen.

2.1.2.1. Cellulaseharz

Cellulase, ein bisher noch nicht kristallin erhaltenes Enzym, zeigt je nach Herkunft ein verschiedenes pH-Optimum der Enzymaktivität. In noch nicht geklärter Weise baut Cellulase Cellulose ab.

M.J. Wolf und Mitarbeiter (43) sowie E.T. Reese und Mitarbeiter (48) fanden ein starkes Absinken der

der Enzymaktivität mit steigendem pH-Wert der Enzymlösung, wobei nicht eindeutig erkennbar ist, ob es sich um eine reversible oder irreversible Denaturierung handelt.

Zur Orientierung wurde Cellulase 24 Stunden mit Pufferlösungen verschiedener pH-Werte nach Theorell und Steinhagen (75) aufbewahrt und die sich anschließende Aktivitätsbestimmung in Anlehnung an die Methode von M.J. Wolf und Mitarbeiter (43) bei pH 5 (irreversible Denaturierung) sowie in Gegenwart des zur Aufbewahrung verwendeten Puffers vorgenommen. Die bei pH 5 gemessene Aktivität der wässrigen Enzymlösung wurde als 100 % bezeichnet.

Unter den gewählten Bedingungen zeigt die Cellulase ein Maximum der Aktivität bei pH 5. Bei höheren pH-Werten sinkt die Aktivität rasch ab (Tabelle 2). Der denaturierende Einfluß höherer pH-Werte auf die Cellulase ist dagegen, wie aus den Meßwerten der Tabelle 2 hervorgeht, relativ gering.

Tabelle 2

pH-Abhängigkeit der Cellulaseaktivität

pH x	Bestimmung d. Aktivität bei pH 5 nach 24 St. Aufbew. bei pH x	Bestimmung d. Aktivität bei pH x nach 24 St. Aufbew. bei pH x
2,9	92,5 %	85,0 %
5,0	100,0 %	100,0 %
6,1	94,5 %	42,6 %
6,8	93,0 %	43,7 %
8,2	94,5 %	30,5 %
9,5	79,5 %	10,7 %
10,3	48,6 %	6,1 %
0,1n NaHCO ₃	58,8 %	8,0 %

Die Aktivitätsbestimmungen der zwischen pH 6 und pH 8 aufbewahrten Cellulaselösung, die im pH-Optimum von pH 5 durchgeführt wurden, ergaben Werte von ca. 95 %. Erst bei Aufbewahrung der Cellulase in Lösungen mit pH 9,4 und 10,3 sinkt die Aktivität ab. Die für 0,1 in NaHCO_3 -Lösung (pH 8,4) gefundene starke Denaturierung sollte sich bei der Umsetzung mit dem Copolymerisat nicht auswirken, da der pH-Wert der Lösung durch die freien Caroxylgruppen des Copolymerisates auf 7,7 absinkt. Die weiteren Untersuchungen bestätigen diese Überlegungen.

Die durch Umsetzung mit Cellulaselösung erhaltenen Enzymharze weisen nur eine geringe Enzymaktivität auf, deren Ursache noch erläutert werden soll, obwohl die gebundene Menge von 206 mg pro 1 g Harz (Tabelle 3a) mit den Ergebnissen, die bei der analogen Reaktion des Harzes mit Diastase, Pepsin und Alkoholdehydrogenase erzielt wurden (16), vergleichbar ist. Daß die an dem Harz bestimmte Enzymaktivität tatsächlich von gebundenem Enzym herrührt, läßt sich aus der wiederholt an derselben Harzprobe bestimmbar Aktivität schließen. Auch die nach der wiederholten Umsetzung des Cellulaseharzes mit dem Substrat durchgeführte Bestimmung der Aktivität in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer auf das Substrat deutet darauf hin (Tabelle 3 b).

Tabelle 3 a
Eigenschaften des Cellulaseharzes

gebundene Cellulase [mg/gHarz] ⁺	geb. Cellulase bildet m g Glucose im gelösten Zust.	geb. Cellulase bildet nach 1 St. bei 37° C mg Glucose				
		1.	2.	3.	4.	5.
		Umsetzung				
206	378	0,80	0,48	0,44	0,32	0,28

⁺) in [mg/g Harz] ist hier sowie bei allen späteren Angaben die von 1 g des zur Reaktion mit dem Enzym eingesetzten Harzes gebundene Enzymmenge angegeben.

Tabelle 3 b

Aktivität des Cellulaseharzes in Abhängigkeit
von der Einwirkungszeit auf das Substrat

Einwirkungszeit des Substrates bei 37°C (Stunden)	1	2	8
gebildete Menge Glu- cose von 206 mg ge- bundener Cellulase (mg)	0,21	1,04	3,11

Die geringe Enzymaktivität des Cellulaseharzes, 0,2 % der Aktivität der gebundenen Cellulasemenge im gelösten Zustand (Tabelle 3a), ließ eine Denaturierung des Enzyms durch das reaktionsfähige Copolymerisat oder das Reaktionsmedium vermuten. Da aber die zur Umsetzung mit dem Copolymerisat eingesetzte Enzymlösung nach der Reaktion keinen Aktivitätsverlust aufwies, muß der beobachtete scheinbare Aktivitätsverlust des Enzymharzes vielmehr auf eine selektive Bindung von inaktiven Eiweißanteilen aus der Rohcellulase zurückgeführt werden.

2.1.2.2. Trypsinharz

Bereits M.A. Mitz und L.J. Summaria (8) sowie E. Katchalski und Mitarbeitern (11) war es gelungen, aktive Trypsinharze zu synthetisieren. Während M.A. Mitz und L.J. Summaria (8) Carboxymethylcelluloseazid als reaktionsfähiges Trägermaterial verwendeten, kuppelten E. Katchalski und Mitarbeiter (11) Trypsin an ein diazotiertes Copolymerisat aus p-Aminophenylalanin und Leucin. Ein hochaktives polymeres Trypsin wurde von letzteren auch bei der Umsetzung ihres diazotierten Copolymerisates mit einem Polytyrosyltrypsin (44) erhalten.

Bei der Umsetzung des nitrierten reaktionsfähigen Copolymerisates aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid mit Trypsin gelang es zwar 300-400 mg Enzym pro 1g Harz zu binden, dieses Trypsinharz zeigte aber keinerlei Enzymaktivität. Trypsin, dessen Aktivitätsmaximum zwischen pH 5 und pH 7 liegt, wurde zur näheren Untersuchung dieses Ergebnisses in 0,1n und 0,2n NaHCO_3 -Lösung 3 Tage aufbewahrt. Die Aktivität sank dabei um 15 % bzw. 24,5 % des ursprünglichen Wertes ab. Die Zugabe von 2.4-Dinitrofluorbenzol, dem reaktionsfähigen Molekülanteil des Copolymerisates, zu wässriger Trypsinlösung rief nach der gleichen Zeit einen Aktivitätsverlust von 8,5 % hervor, während in schwach alkalischer Lösung (0,1 n NaHCO_3) durch 2.4-Dinitrofluorbenzol ein Aktivitätsverlust von 68,4 % auftrat. Vergleichbare Ergebnisse lieferte eine ähnliche Versuchsanordnung mit dem reaktionsfähigen Copolymerisat. Eine in wässriger Trypsinlösung umgesetzte Probe des Copolymerisates zeigte keine Enzymaktivität, die überstehende Enzymlösung keinen Aktivitätsverlust. Der gleiche Versuch mit 0,1 n NaHCO_3 -haltiger Enzymlösung ausgeführt, ergab einen Aktivitätsverlust der überstehenden Lösung von 85 %, aber keinerlei Aktivität des Enzymharzes. Während die Umsetzung der funktionellen Gruppen des Trypsins mit Diazoniumsalzen und Säureaziden unter geringen Aktivitätsverlusten gelingt, wie die Arbeiten von M.A. Mitz und L.J. Summaria sowie E. Katchalski und Mitarbeiter zeigen, verläuft die Reaktion mit 2.4-Dinitrofluorbenzol wie auch die Acylierung mit Essigsäureanhydrid (45) unter hohem Aktivitätsverlust. Es muß daher angenommen werden, daß bei der Reaktion zwischen Trypsin und 2.4-Dinitrofluorbenzol bzw. dem nitrierten Copolymerisat aus Methacrylsäure/Methacrylsäure-m-fluoranilid besonders die für die Enzymaktivität verantwortlichen funktionellen Gruppen des Trypsins in Reaktion treten.

2.1.2.3. Papainharz

Papain sollte sich aus den verschiedensten Gründen besonders gut zur Darstellung hochaktiver Enzymharze verwenden lassen. Papain besitzt ein relativ niedriges Molgewicht von 22000. Es ist im Bereich von pH 5-7 auch bei höheren Temperaturen als Zimmertemperatur stabil. Zwei Drittel des insgesamt 180 Aminosäure enthaltenden Moleküls ist für die Enzymaktivität nicht essentiell, wobei die Enzymaktivität, was für die Umsetzung mit dem Polymeren vielleicht wichtig ist, nicht an die endständigen Aminosäuren gebunden ist (46).

Bei den bisherigen Umsetzungen des nitrierten Copolymerisates aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid mit den verschiedenen Enzymen störten bei den nach der Reaktion erforderlichen Eiweißbestimmungen geringe Mengen bei der Nitrierung des Copolymerisates entstehender alkalilöslicher Abbauprodukte. Es war deshalb erforderlich, das Copolymerisat nach der Nitrierung und vor der Umsetzung mit dem Eiweiß einer nochmaligen Reinigung durch Extraktion mit Aceton zu unterwerfen.

Alle folgenden Umsetzungen wurden nunmehr mit Proben dieses so hergestellten Harzes durchgeführt. Die in üblicher Weise (s. Experimenteller Teil) durchgeführte Umsetzung zwischen dem gereinigten Copolymerisat und Papain verlief erfolgreicher als die hier bisher beschriebenen Umsetzungen mit Enzymen. So war es möglich 1100 mg Papain an 1 g eingesetztes Copolymerisat zu binden (Tabelle 4), während nur 200 mg Cellulase bzw. 300-400 mg Trypsin pro 1 g Harz gebunden werden konnten.

Die bei der Umsetzung zwischen Papain und Copolymerisat auftretende starke Konzentrationsänderung der

Enzymlösung (es waren bisher jeweils 400 mg Papain in 20 ml Lösung mit Harzproben umgesetzt worden), legte es nahe, in diesem Falle die Abhängigkeit des Umsatzes bei konstanter Papainkonzentration und konstanter Umsetzungszeit zu überprüfen.

Bei Harzeinwaagen über 100 mg verläuft die Reaktion bei der oben angegebenen Papainkonzentration nicht bis zum optimalen Umsatz, sondern nur zu 50 % (s. Tabelle 4).

Tabelle 4

Abhängigkeit des Umsatzes des nitrierten Copolymerisates mit Papain von der Harzeinwaage bei konstanter Enzymmenge

reaktionsf. Copolymeri- sat [xmg Harz- einwaage]	zur Reaktion eingesetzte Papainkonzen- tration	gebundene Menge Papain [mg/xmg Harz- einwaage]	gebundene Menge Papain [mg/100 mg Harz]
297,0	400mg/20ml	167,5	56,2
299,4	"	167,0	56,4
98,7	"	108,0	109,2
100,3	"	108,5	108,0
100,9	"	115,0	114,0
50,2	"	55,0	109,0
51,4	"	58,0	113,0

Die Enzymaktivität der aus den ca. 100mg Harzproben gewonnenen Papainharze wurde in Anlehnung an die Methode von E.L. Smith und A. Stockell (47) mit α -N-Benzoyl-L-argininamid.HCl.H₂O als Substrat geprüft und mit der Aktivität entsprechender Mengen freien Papains verglichen. 1 mg des hier verwendeten Papains desamidierte im gelösten Zustand in 30 Min. bei 37°C $0,36 \cdot 10^{-5}$ Mole Substrat.

Um sicher zu sein, daß die zur Bestimmung der zu erwartenden hohen Enzymaktivität notwendige Proportionalität zwischen Enzymmenge und umgesetzter Substratmenge gewährleistet ist, wurde geprüft, ob die

Aktivitätsbestimmung unabhängig von der angewendeten Substratkonzentration verläuft, d.h., ob auch bei längerer Einwirkungszeit des Papainharzes auf das eingesetzte Substrat im Reaktionsgemisch eine noch genügende Menge Substrat vorhanden ist. Dazu wurde eine aus 162 mg nitrierten Copolymerisates dargestellte Papainharzprobe mit 2 ml 0,1 m Cysteinlösung (pH 5,1) bei 37°C aktiviert, mit 2 ml Pufferlösung (pH 5,1) und 20 ml 0,1 Substratlösung versetzt und bei 37°C im Thermostaten gerührt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben von 3 ml entnommen und die desamidierte Substratmenge titrimetrisch bestimmt. Der Verlauf der Reaktion ist in Abb. 1 dargestellt.

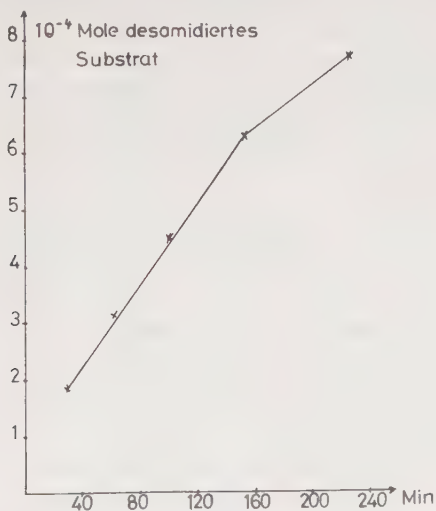


Abb. 1: Enzymaktivität einer aus 162 mg nitriertem Copolymerisat dargestellten Papainharzprobe in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit auf das Substrat

Nach 150 Minuten Einwirkungszeit des Papainharzes auf das Substrat tritt eine deutliche Änderung des Anstieges der Geraden auf. Nach dieser Zeit sind insgesamt $6,4 \cdot 10^{-4}$ Mole Substrat desamidiert und das Volumen der Reaktionslösung durch die Probeentnahmen

von 24 ml auf 6 ml verringert worden. Daraus folgt, daß die verbleibende Reaktionslösung nach 150 Minuten weniger als 50 % unumgesetztes Substrat enthält. Die für die Bestimmung der Enzymaktivität erforderliche Proportionalität zwischen Enzymmenge und umgesetzter Substratmenge ist also bei einem ca 50 %igem Substratüberschuß gewährleistet.

Für die weiteren Aktivitätsbestimmungen der Papainharze wurde daher der sich aus dieser Versuchsanordnung ergebende notwendige Substratüberschuß von ca 50 %, bezogen auf die vorher bestimmte Menge gebundenes Papain, angewendet. Die Enzymaktivität der Papainharze ist mit durchschnittlich 46,5 %, bezogen auf die Aktivität der gebundenen Papainmenge im gelösten Zustand, im Vergleich zu den bisher erreichten Enzymaktivitäten, wie 3 % bei dem Diastaseharz und 22 % bei Bepsinharz (16), recht hoch (Tabelle 5).

Die Papainharze zeigen eine gute Beständigkeit gegenüber der wiederholten Umsetzung mit dem Substrat innerhalb längerer Zeitintervalle. Bei der Beurteilung der auftretenden Schwankungen der in Tabelle 5 angegebenen Werte ist zu berücksichtigen, daß die Papainharze zur Aktivitätsbestimmung nicht vollständig von dem überstehenden Wasser befreit werden können (siehe Exp. Teil), was zu Ungenauigkeiten bei der Titration der aus Δ -N-Benzoyl-L-argininamid.HCl.H₂O gebildeten freien Aminosäure führt. Unter Berücksichtigung dieser Ungenauigkeiten kann ein 50 %iger Aktivitätsverlust innerhalb von 38 Tagen nach siebenmaliger Umsetzung des Papainharzes mit dem Substrat bzw. nach neunmaliger Umsetzung innerhalb von 64 Tagen festgestellt werden. Der Aktivitätsverlust ist wesentlich geringer, nämlich nur 8 %, wenn das Papainharz innerhalb von 38 Tagen nur viermal mit dem Substrat umgesetzt wird, wobei die 3. Umsetzung in Tabelle 5 am 6. Tag erfolgte.

2.1.2.4. Leucinaminopeptidaseharz

Auch Leucinaminopeptidase mit einem Optimum der Enzymaktivität bei pH 8 sollte für die Umsetzung mit dem reaktionsfähigen Copolymerisat zur Darstellung enzymaktiver Polymerer geeignet sein. Die zur Verfügung stehende Peptidase wurde zur Kontrolle auf Verunreinigung durch andere Proteasen einer Aktivitätsprüfung mit α -N-Benzoyl-L-argininamid.HCl.H₂O unterworfen. Wie erwartet, trat keine Desamidierung des Substrates ein. Die Aktivitätsbestimmung mit L-Leucinamid, dem spezifischen Substrat für Leucinaminoneptidase, verlief dagegen erfolgreich.

Tabelle 6

Eigenschaften des Leucinaminopeptidaseharzes

gebundene Menge Leucinaminopeptidase [mg/1gHarz]	geb.Leucinaminopeptidase menge desamidiert im gelösten Zustand in 30 Min. bei 37°C Mole Substrat	gebundene Leucinaminopeptidase desamidiert in 30 Min bei 37°C Mole Substrat · 10 ⁻⁴					
		1.	2.	3.	4.	5.	6.
				Umsetzung			
280	4,06 · 10 ⁻⁴	0,58	0,62	0,53	0,45	0,38	0,38
230	3,38 · 10 ⁻⁴	0,49	0,65	0,32	0,35	0,41	

Die an das Harz gebundenen Mengen Leucinaminopeptidase von 230 mg bzw. 280 mg pro 1 g Harz (Tabelle 6) lassen sich mit den bei Cellulase und Trypsin erzielten Umsetzungen vergleichen, sie liegen aber deutlich niedriger als die von 1 g Harz gebundenen Mengen Papain.

Die Aktivität der dargestellten Leucinaminopeptidaseharze liegen ebenfalls unter denen der Papainharze. Nur 15 % der Aktivität, die die gebundene Enzymmenge im gelösten Zustand aufwies, war am Leucinaminopeptidaseharz nachzuweisen. Der Aktivitätsverlust von ca. 40 % nach sechsmaliger Umsetzung des Leucinaminopeptidaseharzes mit dem Substrat innerhalb von 52 Tagen zeigt einen dem Papainharz ähnlichen Verlauf (Tabelle 6).

2.1.2.5. Dextransaccharaseharz

Dextransaccharase wurde als Beispiel für eine Synthese ausgewählt. Sie konnte in Form einer 70 000 Einheiten (siehe Exp. Teil) enthaltenden Suspension, die Herr Professor Dr. Patat freundlicherweise zur Verfügung gestellt hatte, benutzt werden. Dextransaccharase ist im Bereich von pH 4 bis pH 6 stabil, verliert aber in alkalischer Lösung rasch an Aktivität. Da die Umsetzung mit dem reaktionsfähigen Copolymerisat nur im schwach alkalischen Medium erfolgt, wurde zunächst der Einfluß von Natriumacetatpuffern verschiedener pH-Werte sowie 0,1 n NaHCO_3 -Lösung auf die Enzymaktivität der Dextransaccharase untersucht. Die sich anschließenden Aktivitätsbestimmungen wurden unter optimalen Bedingungen, pH-Wert 5,2, vorgenommen.

Bei 24stündiger Einwirkung von Natriumacetatpuffer mit dem pH-Wert 7,8 trat ein Aktivitätsverlust von 7 % auf, während die Einwirkung von 0,1 n NaHCO_3 -Lösung in gleicher Zeit einen Aktivitätsverlust von 38 % verursachte (Tabelle 7).

Tabelle 7

pH-Abhängigkeit der Dextransaccharaseaktivität

24stündige Aufbewahrung der Dextransaccharase in Na-Acetatpuffer von pH	Aktivität der Dextran- saccharase, gemessen bei pH 5,2 in %
5,3	100,0
6,5	98,5
6,9	97,5
7,8	93,0
in 0,1 n NaHCO ₃ -Lösung (pH 8,4) ³	62,0

Da aber bei der in 0,1 n NaHCO₃-Lösung erfolgenden Umsetzung des Copolymerisates mit dem Enzym ein Teil der OH-Ionen durch die Carboxylgruppen des Polymeren neutralisiert werden, sinkt der pH-Wert der Reaktionslösung auf pH 7,7 ab, was im Falle der Dextransaccharase eine wesentlich geringere Desaktivierung bedeuten würde.

Trotzdem verlief die Umsetzung des Copolymerisates mit der Enzymsuspension nicht erfolgreich. Das erhaltene "Enzymharz" zeigte keinerlei Enzymaktivität, wogegen die zur Reaktion eingesetzte und nach der Umsetzung überstehende Enzymlösung nur noch 10 % der ursprünglichen Aktivität enthielt.

Ein Kontrollversuch mit 2.4-Dinitrofluorbenzol als Reaktionspartner des Enzyms, hatte einen 86%igen Aktivitätsverlust der Dextransaccharase zur Folge.

Der geringen zur Verfügung stehenden Enzymmenge wegen mußte leider auf eine Bestimmung der an das Copolymerisat bei der Umsetzung mit dem Enzym gebundenen Enzymmenge verzichtet werden.

2.2. Nitrierte Copolymerisate aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid mit makroporöser Struktur

Die bisher an dem nitrierten Copolymerisat aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid mit den verschiedensten Enzymen erzielten Umsätze betrugen ca. 300 mg Enzym pro 1 g Harz. Lediglich bei der Reaktion mit Papain konnte eine größere Menge Enzym (1100 mg Papain/1g Harz) gebunden werden. Bei allen verwendeten Enzymen war jedoch die Reaktion zwischen dem Copolymerisat und dem Enzym stets mit einer mehr oder minder starken Aktivitätsverminderung des Enzyms verbunden.

Bei einer vorgegebenen reaktionsfähigen Träger-substanz kann bisher nur über die Menge des gebundenen Enzyms ein Einfluß auf die Enzymaktivität pro 1 g Enzymharz ausgeübt werden. Dies wiederum ist nur über eine Vermehrung der Zahl der zugänglichen reaktionsfähigen Zentren pro Teilchen, d.h. über eine Vergrößerung der Oberfläche der zur Reaktion mit einem Enzym eingesetzten Harzteilchen möglich. Auf einfachste Weise wird die Oberfläche eines synthetischen Polymeren, bei gleichbleibender Korngröße, durch die Darstellung von Polymeren mit makroporöser Struktur (Schwammstruktur) vergrößert. Allgemein wird eine makroporöse Struktur durch Polymerisation des Monomeren in Gegenwart eines Lösungsmittel erreicht, in dem das Monomere bzw. das Monomeregemisch zwar löslich ist, aber das entstehende Polymere weder löslich noch quellbar sein darf. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, daß derartig hergestellte Polymere extrem rauhe Oberflächen besitzen, die von einer Vielzahl von Poren der verschiedensten Größe (100 - 1000 Å) durchzogen werden (48).

Der Darstellung von Copolymerisation aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid mit Schwammstruktur in der oben geforderten Weise stellten sich jedoch verschiedene Schwierigkeiten entgegen. Obwohl die Copolymerisation von Methacrylsäure mit Methacrylsäure-m-fluoranilid in Gegenwart von 50 Gew.% Benzin (bezogen auf das Monomergemisch, Kp 150-195°C) zu festen, weißen, undurchsichtigen Produkten führt, aus denen sich das eingeschlossene Benzin unter Erhalt der Schwammstruktur durch Extraktion mit Petroläther oder durch vorsichtiges Ausheizen bei 50 - 70°C im Vakuum entfernen ließ, verloren diese Harze jedoch ihre makroporöse Struktur bei der sich anschließenden Extraktion mit Methanol, die zur Entfernung von Monomeren und niedermolekularen Anteilen notwendig ist. Die Proben quollen stark auf, wurden sehr weich und beim vorsichtigen Trocknen hart und durchsichtig. Erst als die mit Methanol extrahierten Proben vor dem Trocknen sofort einer nochmaligen Extraktion mit Petroläther unterzogen wurden, wobei die Extraktion über 7-8 Stunden bei zweimaligem Wechsel des Petroläthers durchgeführt werden mußte, gelang es, die poröse Struktur zu erhalten. Eine weitere Schwierigkeit bereitete die Reinigung des zur Aktivierung des Fluors nitrierten Copolymerisates. Wie bereits ausgeführt, tritt bei der Nitrierung mit $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ ein geringfügiger Abbau des Copolymerisates ein. Die dabei entstehenden alkalilöslichen Produkte stören erheblich die nach der Umsetzung mit Enzymen erforderliche Eiweißbestimmung in der Reaktionslösung. Während die nitrierten Blockpolymerisate ohne Schwammstruktur durch Extraktion mit Aceton von diesen Abbauprodukten leicht befreit werden konnten, quollen die Copolymerisate mit Schwammstruktur bei der Acetonbehandlung stark auf und verloren bei dem sich anschließenden Trocknungsprozeß vollständig ihre makro-

poröse Struktur. Erst als es gelang, das Aceton vor dem Trocknen der Proben langsam durch Wasser zu verdrängen, war es möglich, die Schwammstruktur auch hier zu erhalten. Bei der Durchführung der an zahlreichen Vorproben ermittelten günstigsten Reaktions- und Aufarbeitungsbedingungen trat als weitere Schwierigkeit die mangelnde mechanische Stabilität des wie das Copolymere ohne Schwammstruktur mit 1 Gew-% Divinylbenzol (DVB) vernetzten Produktes störend in Erscheinung. Durch Erhöhung des Anteils an DVB würde zwar eine größere mechanische Stabilität des Copolymerisates erreicht werden, gleichzeitig wäre aber damit auch eine geringere Quellbarkeit verbunden, was sich wiederum nachteilig auf die Reaktionsfähigkeit der Copolymerisate auswirken würde.

Um ein Copolymerisat aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid mit Schwammstruktur zu synthetisieren, das neben der notwendigen mechanischen Stabilität eine genügende Quellbarkeit besitzt, wurden daher Proben systematisch mit steigenden Vernetzergehalten (1-9 Gew.-% DVB) polymerisiert und unter den beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen aufgearbeitet. Die Schwammstruktur der so erhaltenen Proben wurde an Hand der nach H. Corte und A. Meyer (49) gemessenen Cyclohexanaufnahme verfolgt.

Tabelle 8

Cyclohexanaufnahme der Copolymerisate aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid mit Schwammstruktur

Molverhältnis Methacrylsäure/Methacrylsäure-m-fluoranilid z. Polymerisation eingesetzt	Gehalt an DVB [Gew. %]	Cyclohexanaufnahme [mg/ 1g Harz]
1:1	1 +)	488
1:1	2	494
1:1	3	567
1:1	4	445
1:1	5	317
1:1	6	352
1:1	7	398
1:1	8	442
1:1	9	397

+) im nachfolgenden Text wird der %-Gehalt an DVB als Kennziffer der Harze verwendet.

2.2.1. Papainharze

Für die Untersuchung der Reaktionsfähigkeit der erhaltenen makroporösen nitrierten Copolymerisate aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid wurde die Umsetzung mit Papain ausgewählt, da von den zur Verfügung stehenden und hier bisher verwendeten Enzymen mit Papain die höchste Aufnahme bei geringstem Aktivitätsverlust beobachtet worden war.

Die mit steigendem Vernetzergehalt polymerisierten Proben aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid mit Schwammstruktur zeigen deutlich eine unterschiedliche mechanische Stabilität. So fällt z.B. beim Aussieben der in gleicher Weise zerkleinerten Harzproben bei Harz 1 die Kornfraktion 0,1-0,2mm $\varnothing$

die für die Umsetzungen mit Papain eingesetzt wurde, und die Kornfraktion $< 0,1 \text{ mm } \varnothing$ im Gewichtsverhältnis 10:6 an, während das Verhältnis bei Harz 9 mit 10:2,3 wesentlich günstiger liegt.

Die Cyclohexanaufnahme der mit steigendem Gehalt an DVB polymerisierten Proben läßt keine eindeutige Abhängigkeit vom Vernetzergehalt erkennen (Tabelle 8). Die Aufnahme von 30-55 Gew.-Proz. Cyclohexan weist jedoch deutlich auf das Vorhandensein einer makroporösen Struktur hin.

Das Papainbindungsvermögen der in $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ nitrierten Copolymerisate mit Schwammstruktur läßt dagegen eindeutigere Zusammenhänge erkennen (Tabelle 9). Die an Harz 1 und Harz 1⁺ (verschiedene Copolymerisate mit jeweils 1 % Vernetzer) gebundene Menge Papain von 283 bzw. 350 mg pro 100 mg eingesetztes Harz liegt wesentlich höher als bei den Proben mit höherem Vernetzergehalt. Bei einer Erhöhung des Vernetzergehaltes auf 2 % sinkt die gebundene Papainmenge auf 56,5 % des bei Harz 1⁺ erreichten Wertes ab, d.h. es werden nur noch 186 mg Papain pro 100 mg Harz gebunden. Wird der Vernetzergehalt auf 3 Gew.-Proz. erhöht, so vermag das resultierende Copolymerisat nur noch 32,6 % der an Harz 1⁺ beobachteten Papainmenge zu binden. Dagegen verringert sich die pro 100 mg Harz zu bindende Papainmenge bei einer weiteren Erhöhung des Vernetzergehaltes über 3 Gew.-Proz. hinaus nicht mehr. Bis zu einem Vernetzergehalt von 9 Gew.-Proz. DVB liegt die gemessene Papainaufnahme zwischen 100 und 130 mg pro 100 mg Harz. Wie die bei Harz 1 und Harz 1⁺ (jeweils 1 Gew. % DVB) beobachtete unterschiedliche Papainaufnahme erkennen läßt, muß dagegen bei einem niedrigen Vernetzergehalt das Enzymbindungsvermögen der Harze wesentlich stärker von der jeweiligen zufällig vorliegenden Oberflächenstruktur abhängig sein.

Um sicher zu sein, daß die relativ großen Papainmengen tatsächlich chemisch an die nitrierten Copolymerisate mit Schwammstruktur gebunden sind und nicht infolge der stark vergrößerten Oberfläche adsorptiv aufgenommen werden, wurden entsprechende nichtnitrierte Copolymerisate in Kontrollversuchen mit Papain behandelt. Wie erwartet, wurde nach dem Auswaschen der Copolymerisate die gesamte zur Reaktion eingesetzte Enzymmenge im Waschwasser wiedergefunden. Die an den Papainharzen 1 bis 9 bestimmten Enzymaktivitäten liegen, vergleicht man die gebundene Menge Papain mit einer gleich großen Menge Enzym in Lösung, mit 50 bis 82 % deutlich höher als bei dem Papainharz ohne Schwammstruktur. Überraschenderweise zeigt das Papainharz 8 mit 82 % den höchsten Wert, während das noch höher vernetzte Papainharz 9 mit 34 % den niedrigsten Wert in der Reihe der Papainharze mit Schwammstruktur aufweist. Es ist auffällig, daß der letztere Wert noch unter dem der Aktivität des Papainharzes ohne Schwammstruktur liegt.

Die Beständigkeit der einzelnen Papainharze zeigt keine wesentlichen Unterschiede. Nach zehnmaliger Umsetzung derselben Harzprobe mit jeweils frischem Substrat war die ursprüngliche Aktivität der einzelnen Harzproben noch zu durchschnittlich 50 % erhalten geblieben. (Tabelle 9).

Tabelle 9

Eigenschaften der Papainharze mit Schwammstruktur

DVB [Gew. %]	gebundene Menge Papain [mg/100mg Harz]	geb. Papain desamidiert im gelösten Zustand in 30 Min. bei 37°C Mole Substrat	gebundene Menge Papain desamidiert in 30 Min. bei 37°C Mole Substrat · 10 ⁻⁴									
			1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
1	283	10,2·10 ⁻⁴	5,62	5,48	5,16	4,98	4,30	4,44	4,54	4,64	3,88	3,56
1 ⁺	350	11,1·10 ⁻⁴	5,98	5,84	5,46	5,36	-	-	-	-	-	-
2	186	6,68·10 ⁻⁴	3,32	3,18	3,06	2,42	2,48	2,44	2,28	2,26	2,04	1,94
3	114	4,10·10 ⁻⁴	3,14	2,84	2,76	2,42	1,85	1,84	1,78	1,96	1,94	1,84
4	102	3,68·10 ⁻⁴	2,32	2,12	1,98	1,60	1,48	1,42	1,30	1,52	1,52	1,12
5	98	3,53·10 ⁻⁴	2,28	1,84	1,74	1,96	1,44	1,32	1,36	1,36	1,14	1,14
6	128	4,60·10 ⁻⁴	2,88	2,68	2,46	2,38	2,30	2,26	2,28	2,06	2,32	2,30
7	130	4,63·10 ⁻⁴	3,34	3,38	3,18	3,12	2,90	3,10	2,60	2,38	2,32	2,10
8	102	3,62·10 ⁻⁴	3,06	2,68	2,44	2,74	2,60	2,52	2,30	1,38	1,34	1,02
9	133	4,78·10 ⁻⁴	1,66	1,32	0,98	0,86	0,76	0,81	0,82	0,84	0,75	0,68

2.3. Reaktionsfähige Polymere mit Isothiocyanatgruppen

Die Reaktionsfähigkeit der Isothiocyanate gegenüber Aminen wird bereits seit längerer Zeit erfolgreich in der Peptidchemie und der Immunologie ausgenutzt. So werden z.B. die N-terminalen Aminosäuren in Peptiden, Proteinen und Enzymen u.a. durch Umsetzung mit Phenylsenföl nach Edman (39) bestimmt. In der Immunologie hat sich bei der histochemischen Anfärbung und der Fluoreszenz-Antikörper-Technik (50) die Verwendung von Isothiocyanatderivaten des Fluorescein, des Rhodamin B und anderer Farbstoffe bewährt.

Polymere mit Isothiocyanatgruppen sollten sich daher auch zur Darstellung von Protein- und speziell von Enzymharzen eignen, zumal die Isothiocyanatgruppe gegenüber den bisher verwendeten funktionellen Gruppen eine Reihe von Vorzügen aufweist. So sind Isothiocyanate gegenüber einer Hydrolyse so beständig, daß sie häufig durch eine Wasserdampfdestillation gereinigt werden können. Es ist daher auch keine Hydrolyse der funktionellen Gruppe bei der zur Erhaltung der Enzymaktivität bzw. der Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen notwendigerweise in wässrigem Medium verlaufenden Umsetzungen der polymeren Isothiocyanate mit Enzymen oder Proteinen zu befürchten, wie sie bei der Verwendung polymerer Isocyanate beschrieben wurde (21).

Die Reaktionsfähigkeit der hier beschriebenen nitrierten Copolymerisate aus Methacrylsäure/Methacrylsäure-m-fluoranilid sowie der anderen im Arbeitskreis G. Manecke synthetisierten, die Dinitrofluorphenylgruppe enthaltenden reaktionsfähigen Polymere (14) gegenüber Proteinen beruht auf einer nucleophilen

Substitution des durch Substituenten mit (-)-M- und (-)-I-Effekt aktivierten Fluors durch NH_2 -, OH- und SH-Gruppen. Die Möglichkeit zur Darstellung reaktionsfähiger Polymerer mit dieser Struktur ist im wesentlichen auf die Polymerisation aromatischer Fluorverbindungen mit nachträglicher Aktivierung z.B. Nitrierung beschränkt, während die Additionsreaktion der Isothiocyanate mit Amino-, Hydroxy- oder Sulfhydrylgruppen der Enzyme weder an eine Aktivierung der funktionellen Gruppe noch überhaupt an das aromatische System gebunden ist. Damit lassen sich einmal sowohl aliphatische als auch aromatische Isothiocyanate als Ausgangsverbindungen zur Darstellung reaktionsfähiger polymerer Isothiocyanate verwenden, zum anderen kann die Isothiocyanatgruppe sowohl in polymerisationsfähige Monomere als auch in Polymere mit geeigneten Gruppen, z.B. primären Aminogruppen durch Umsetzung mit Thiophosgen, eingeführt werden.

Bei der Polymerisation monomerer Isothiocyanate ist zu beachten, daß neben der -C-C-Polymerisation grundsätzlich auch eine Kettenbildung über die Isothiocyanatgruppen erfolgen könnte, wie sie von R.C. Schulz und R. Stenner (51) bei der Polymerisation von Vinylisocyanat beobachtet wurde. In einem solchen Falle wäre mit einem nur geringen Gehalt an freien Isothiocyanatgruppen im Polymeren bzw. mit uneinheitlichen Polymerisaten zu rechnen.

Die radikalische Polymerisation von ungesättigten aliphatischen Isothiocyanaten beschreiben G.D. Jones und R.I. Zimmerman (52). Sie synthetisierten Vinylisothiocyanat und erhielten bei dessen Polymerisation lösliche Produkte über deren Gehalt an freien Isothiocyanatgruppen keine näheren Angaben gemacht werden. Bei der Polymerisation von p-Isothiocyanatostyrol mit Δ, Δ' -Azobisisobutyronitril (ABN)

erhielten G.G. Overberger und H.A. Friedman nur ölige Produkte. Möglicherweise ist es in diesem Falle durch die Konjugation der Isothiocyanatgruppe mit der paraständigen Vinylgruppe zu einer Kettenbildung auch über die Isothiocyanatgruppe gekommen.

Um diesen für die ungenügende Polymerisation des p-Isothiocyanatostyrols gegebenenfalls verantwortlichen Effekt von vornherein auszuschließen, wurde das bisher noch nicht beschriebene m-Isothiocyanatostyrol synthetisiert und zur Polymerisation eingesetzt. Es gelang, wie später ausgeführt werden soll, ein einheitliches festes Polymerisat mit freien Isothiocyanatgruppen zu erhalten,

Ein weiterer Vorteil der Isothiocyanatgruppe gegenüber den bisher verwendeten funktionellen Gruppen liegt in ihrer relativ einfachen analytischen Bestimmungsmöglichkeit. Die Isothiocyanatgruppe weist eine charakteristische, ausgeprägte Absorptionsbande bei 2000 cm^{-1} auf. Durch Umsetzung mit n-Butylamin können Isothiocyanate quantitativ bestimmt werden.

Ein zur Reaktion mit Proteinen und Enzymen einzusetzendes Polymeres muß, wie schon ausführlich erörtert, neben den reaktionsfähigen funktionellen Gruppen noch genügend hydrophilen Charakter aufweisen, um im wässrigen Medium benetzbar zu sein. Eine ausreichende Benetzbarkeit der Polymeren wird im allgemeinen durch Einführung von Carboxyl- oder Sulfonylgruppen erreicht.

So wurden hier Acrylsäure und Methacrylsäure zur Copolymerisation mit den hydrophoben Monomeren eingesetzt, sowie durch Sulfonierung die Benetzbarkeit einer polymeren Matrix erreicht. Der Versuch, die

stark polaren Carboxylgruppen durch den hydrophilen wasserlöslichen Acrylsäureester des Diäthylenglykolmonomethyläthers zu ersetzen, ergab keine befriedigenden Ergebnisse.

Ausgehend von den an nitrierten Copolymerisaten aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid mit Schwammstruktur erreichten hohen Umsetzungsgraden mit Enzymen, wurden bei der Darstellung der polymeren Isothiocyanate von vornherein Polymere mit makroporöser Struktur angestrebt.

Es wurden folgende 2 Gruppen von polymeren Isothiocyanaten synthetisiert und zur Umsetzung mit Proteinen und Enzymen eingesetzt.

- I. Polymere Isothiocyanate, die durch Polymerisation der Monomeren
 - a) m-Isothiocyanatostyrol .
 - b) Vinylisothiocyanatgewonnen wurden,
- II. polymere Isothiocyanate, die durch Umsetzung der folgenden, primäre Aminogruppen enthaltende, Polymere
 - a) Lewatit CA 9119 (Farbenfabriken Bayer)
 - b) nitriertes, sulfoniertes und anschließend reduziertes Polystyrol
 - c) Poly-m-aminostyrol
 - d) Polyvinylaminmit Thiophosgen gewonnen wurden.

2.3.1. m-Isothiocyanatostyrol-Copolymerisate

2.3.1.1. Darstellung der Copolymerisate

Das bisher noch nicht beschriebene m-Isothiocyanatostyrol ($Kp_{0,1}$ 62°C, n_D^{20} 1,6613) konnte durch Umsetzung von m-Aminostyrol in Chloroform/Wasser mit Thiophosgen in 95 %iger Ausbeute erhalten werden. Das m-Isothiocyanatostyrol ist eine farblose, sehr unangenehm riechende Substanz, die sich an der Luft schnell dunkel färbt. Das IR-Spektrum zeigt die charakteristische Isothiocyanatbande von 2010 cm^{-1} bis 2130 cm^{-1} . Die radikalische Polymerisation des frisch destillierten m-Isothiocyanatostyrols mit ABN und 1 Gew. % DVB als Vernetzer, unter Sauerstoffausschluß im Bombenrohr bei 50-80°C, führt zu einem hellen, durchsichtigen, harten Produkt mit freien Isothiocyanatgruppen.

Zur Gewinnung der erforderlichen Benetzbarkeit und Oberflächenstruktur wurden Harze mit makroporöser Struktur durch Copolymerisation mit Acrylsäure, Methacrylsäure und dem Acrylsäureester des Diäthylenglykolmonomethyläthers hergestellt.

S. Singer (21) sowie H.J. Förster (14) hatten bei der Untersuchung der die 2.4-Dinitrofluorphenylgruppe enthaltenden Polymeren festgestellt, daß bei einer Vermehrung der hydrophilen Gruppen im Polymerisat das Bindungsvermögen des Polymeren gegenüber Proteinen gesteigert wird. Zur Überprüfung dieses Zusammenhanges wurde bei den Polymeren mit Isothiocyanatgruppen m-Isothiocyanatostyrol mit steigenden Mengen Acrylsäure sowie Methacrylsäure copolymerisiert. Ausgehend von der bei den nitrierten Schwammpolymeren aus Methacrylsäure/Methacrylsäure-m-fluoranilid aufgefundenen Abhängigkeit des Papainbindungsvermögens

vom Vernetzergehalt im Polymeren, wurde m-Isothiocyanatostyrol mit Acrylsäure und Methacrylsäure unter Zusatz von 1 Gew. % DVB als Vernetzer in Gegenwart von 50 Gew. % Benzin (Kp 150-195°C) zu Harzen mit makroporöser Struktur polymerisiert. Wurden dabei m-Isothiocyanatostyrol und Acrylsäure bzw. Methacrylsäure im Molverhältnis 1:1 oder 1:2 eingesetzt, so erwies sich das Copolymerisat mechanisch hinreichend stabil. Bei Erhöhung der hydrophilen Komponenten auf 4 Mole pro Mol m-Isothiocyanatostyrol waren dagegen 2 Gew. % Vernetzer erforderlich.

Bei der Extraktion der erhaltenen Copolymerisate mit makroporöser Struktur zur Entfernung monomerer und niederpolymerer Anteile traten die schon in 2.2. beschriebenen Schwierigkeiten auf. Das dort angegebene Verfahren konnte schließlich auch hier durchgeführt werden, wobei Methanol wegen der zu erwartenden Umsetzung der Isothiocyanatgruppen zum Thiourethan durch Aceton ersetzt wurde.

Bei dem Versuch, m-Isothiocyanatostyrol mit dem Acrylsäureester des Diäthylenglykolmonomethyläther zu festen Harzen mit makroporöser Struktur zu polymerisieren, trat eine Reihe von Schwierigkeiten auf.

So gelang es erst unter Zusatz von 10 Gew. % Vernetzer bei der radikalischen Polymerisation der beiden Komponenten im Molverhältnis 1:1 mit ABN unter Sauerstoffausschluß ein festes, hartes Produkt zu erhalten. Eine geringere Menge Vernetzer oder höherer Anteil des wasserlöslichen hydrophilen Esters führte zu weichen und zähen Produkten. Anfangstemperaturen über 35°C bei der Polymerisation hatten in jedem Falle ein weiches, gummiartiges Produkt zur Folge.

Die analog zu der bei Acrylsäure bzw. Methacrylsäure/m-Isouthiocyanatostyrol-Copolymerisaten durchgeführte Extraktion der monomeren und niederpolymeren Anteile war bei diesem Copolymerisat mit dem Verlust der Schwammstruktur verbunden. Nach einer Reihe von Versuchen gelang die Reinigung des Copolymerisates unter Erhalt der Schwammstruktur dadurch, daß das grob zerteilte Harz zur Entfernung des bei der Polymerisation eingesetzten Benzins nicht bei 50°C im Vakuum aufbewahrt wurde, sondern 2 Tage mit Äther extrahiert, anschließend zur Entfernung monomerer und niederpolymerer Anteile mit Aceton behandelt und dann erneut mit Äther extrahiert wurde.

Die nach der Extraktion vorliegende Zusammensetzung der Proben wurde durch Elementaranalyse ermittelt (Tabelle 10).

Die Schwammstruktur der m-Isouthiocyanatostyrol-Copolymerisate wurde mittels Cyclohexanaufnahme geprüft. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 10

Zusammensetzung der Harze I bis VII

Harz Nr.	Molverh. d. Monomeren zur Polymeri- sation ein- gesetzt	gef. Zusammensetzung der Extraktion der Poly- meren	gef. Zusammensetzung nach gef. Zusammens. entspr. ca. Molverhältnis im Polymeren	C	H	N	S	berechnete Zusammensetzung des Polymeren
				C	H	N	S	
I	Acryls./ m-Isothio- cyanatostyrol	62,15	5,09	6,24	12,46			
II	1:1	60,66	4,75	4,55	10,6	1:1,3		61,8 4,87 5,50 12,6
III	2:1	57,87	4,51	3,08	8,86	2:1		59,0 4,93 4,60 10,5
	4:1					4:1		56,2 5,12 3,12 7,12
	Methacryls./ m-Isothio- cyanatostyrol							
IV	1:1	64,80	5,30	6,22	12,71	1:1		
V	2:1	62,30	5,56	3,86	9,08	2:1		63,2 5,32 5,62 12,9
VI	4:1	60,46	6,28	2,50	4,57	6:1		61,4 5,75 4,20 9,60
	Acrylsäureester d. Diäthylenglykolmonomethyläthers/ m-Isothiocyantostyrol							60,0 6,04 2,00 4,58
VII	1:1	67,76	6,47	4,06	8,63	1:1		66,5 6,25 3,80 8,68

Tabelle 11

Cyclohexanaufnahme der m-Isothiocyanatostyrol-Copolymerisate

Harz Nr.	DVB [Gew. %]	Molverhältnis nach der Ex- traktion	Cyclohe- xanauf- nahme [mg/1gHarz]
I	1	Acrylsäure/m- Isothiocyana- tostyrol 1,3:1	427
II	1	2:1	173
III	2	4:1	200
IV	1	Methacryls./m- Isothiocyana- tostyrol 1:1	643
V	1	2:1	337
VI	2	6:1	290
VII	10	Acryls.ester d. Diäthylenglykol- monomethyläther/ m-Isothiocyana- tostyrol 1:1	1400

Gegenüber den bisher gemessenen Werten ist die Cyclohexanaufnahme des Harzes VII sehr hoch. Die Reaktionsfähigkeit dieses Copolymerisates gegenüber Enzymen erwies sich aber, wie später ausgeführt wird, wahrscheinlich als Folge der Feinporigkeit und des damit verbundenen geringen spezifischen Gewichtes (das Copolymerisat der Fraktion 0,1-0,2mm Ø ist leichter als Wasser) als außerordentlich schlecht. Bei den Harzen I bis VI sinkt die Cyclohexanaufnahme mit steigendem Gehalt der hydrophilen Komponenten, wobei die Methacrylsäure/m-Isothiocyanatostyrol-Copolymerisate allgemein mehr Cyclohexan aufnehmen.

Auffällig ist bei Harz VI der hohe Verlust an m-Isothiocyanatostyrol bei der Extraktion, wo-

hingegen die Harze I bis V keine oder nur sehr geringe Veränderung ihrer Zusammensetzung durch die Extraktion erfahren.

2.3.1.2. Umsetzung mit n-Butylamin und Leucinamid

Das für die Bestimmung von Isothiocyanaten übliche Verfahren der Umsetzung mit n-Butylamin und Titration der überschüssigen Base mit Säure wurde auch für die polymeren Isothiocyanate herangezogen. Bei der Beurteilung des erhaltenen Zahlenmaterials ist zu beachten, daß die freien Carboxylgruppen der Copolymerisate n-Butylamin salzartig zu binden vermögen. Die in Tabelle 12 aufgeführten Mengen n-Butylamin können daher kein eindeutiges Maß für den Gehalt an Isothiocyanatgruppen im Polymeren darstellen. Das Fehlen der Isothiocyanatbande in den nach der Reaktion mit n-Butylamin aufgenommenen IR-Spektren zeigt jedoch, daß die polymeren Isothiocyanate mit Schwammstruktur mit dem Amin quantitativ zu den Thioharnstoffderivaten umgesetzt werden können.

Es wurde daher eine Reaktion gewählt, die zur Bestimmung der Isothiocyanatgruppen geeignet ist und auch unter den für die Proteine charakteristischen Bedingungen abläuft. Als Modellsubstanz wurde Leucinamid in 1 n NaHCO_3 - und 0,1 n Na_2CO_3 -Lösung mit den Isothiocyanatharzen umgesetzt (Tabelle 12). Wie aus den IR-Spektren zu erkennen war, verläuft diese Reaktion nicht quantitativ zu den Thioharnstoffderivaten, so daß die Werte in Tabelle 12 als Maß für die in den Harzen zur Umsetzung mit Proteinen zur Verfügung stehenden Isothiocyanatgruppen angesehen werden können.

Tabelle 12

Umsetzung der m-Isothiocyanatostyrol-Copolymerisate mit n-Butylamin und Leucinamid

Harz Nr.	berechneter Gehalt an Isothiocyanatg. [Mole/1g Harz]	gebundene Menge n-Butylamin [Mole/1g Harz]	gebundene Menge Leucinamid			
			Umsetzung in 1n NaHCO ₃ -Lös. [Mole/1g Harz]	% d. Theorie	Umsetzung in 0,1n Na ₂ CO ₃ -Lös. [Mole/1g Harz]	% d. Theorie
I	39,2 · 10 ⁻⁴	59,2 · 10 ⁻⁴	23,8 · 10 ⁻⁴	60,5	35,2 · 10 ⁻⁴	89,6
II	32,8 · 10 ⁻⁴	71,1 · 10 ⁻⁴	20,3 · 10 ⁻⁴	62,3	21,3 · 10 ⁻⁴	65,0
III	20,2 · 10 ⁻⁴	73,0 · 10 ⁻⁴	10,7 · 10 ⁻⁴	53,0	13,5 · 10 ⁻⁴	67,0
IV	40,5 · 10 ⁻⁴	66,6 · 10 ⁻⁴	8,8 · 10 ⁻⁴	21,7	26,2 · 10 ⁻⁴	64,5
V	30,0 · 10 ⁻⁴	52,1 · 10 ⁻⁴	13,3 · 10 ⁻⁴	44,5	14,5 · 10 ⁻⁴	48,3
VI	14,3 · 10 ⁻⁴	46,9 · 10 ⁻⁴	7,3 · 10 ⁻⁴	51,2	9,5 · 10 ⁻⁴	65,5
VII	27,2 · 10 ⁻⁴	24,9 · 10 ⁻⁴	1,4 · 10 ⁻⁴	5,2	4,2 · 10 ⁻⁴	15,5

Deutlich erkennbar ist, daß in 0,1n Na₂CO₃-Lösung. im Vergleich zu der Umsetzung in 1n NaHCO₃-Lösung ein höherer Anteil der im Polymeren enthaltenen Isothiocyanatgruppen mit Leucinamid zu reagieren vermag. Die Reaktionsfähigkeit der Isothiocyanatgruppen in 1n NaHCO₃-Lösung ist offensichtlich von dem hydrophilen Charakter der zur Reaktion eingesetzten Polymeren abhängig. So scheint mit steigendem Gehalt an Acrylsäure bzw. Methacrylsäure jeweils ein höherer Prozentsatz der im Polymeren enthaltenen Isothiocyanatgruppen zur Reaktion mit Leucinamid befähigt zu sein. Das Verhalten des Harzes III gegenüber Leucinamid in 0,1n NaHCO₃-Lösung stellt hierbei eine nicht erklärbare Ausnahme dar.

Dementsprechend zeigt Harz VII, bei dem die Carboxylgruppen verestert sind, eine sehr geringe Reaktionsfähigkeit der Isothiocyanatgruppen gegenüber Leucinamid. Inwieweit allerdings das schon erwähnte sehr

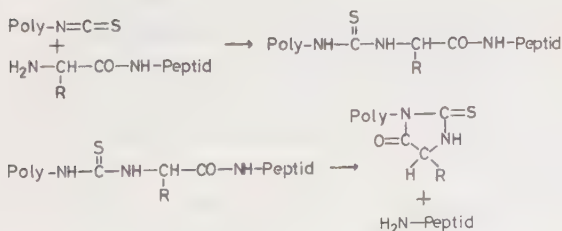
geringe spezifische Gewicht des Harzes VII die eigentliche Ursache für das Verhalten ist, kann nicht entschieden werden.

2.3.1.3. Umsetzung mit Di- und Tripeptiden

Bei den bisher dargestellten und untersuchten Proteinharzen wurde stets das Vorliegen kovalenter Bindungen zwischen den Proteinen und den Polymeren angenommen, ohne daß hierfür ein chemischer Beweis möglich war. Im Falle der polymeren Isothiocyanate ist es dagegen, bedingt durch die speziellen Eigenschaften der funktionellen Gruppe, möglich, die kovalente Bindung von Proteinen an das Polymere zu beweisen.

Eine seit längerer Zeit bekannte Methode des Peptidabbaues (Edman-Abbau) (39) beruht auf der Spaltung des bei der Addition von Phenylsenföhl an die freien NH_2 -Gruppen der Peptide gebildeten Thioharnstoff-derivate.

Es gelang, diese Reaktion an mit polymeren Isothiocyanaten umgesetzten und dadurch an den polymeren Träger gebundenen Di- und Tripeptiden auszuführen, wobei folgende Reaktionsschritte durchgeführt wurden.



Unabhängig von diesen hier beschriebenen Untersuchungen hat C.R. Stark (54) auf die Möglichkeit einer derartigen Reaktion eines Polyisothiocyanatostyrols hingewiesen.

Die Umsetzung des polymeren Isothiocyanates II mit den Peptiden H-Gly-Tyr-OH, H-Gly-Phe-OH, H-Gly-Tyr-Gly-OCH₃ und H-Gly-Phe-Gly-OH erfolgte unter den auch später für die Reaktion mit den Proteinen gewählten schonenden Bedingungen (in NaHCO₃-Lösung, Zimmertemperatur). Die an das Copolymerisat jeweils gebundene Peptidmenge wurde aus der Differenz der zur Umsetzung eingesetzten Menge und der im Waschwasser wiedergefundenen Menge UV-spektroskopisch bestimmt (Tabelle 13). Bei der Behandlung der so gewonnenen Peptidharze mit HCl/Eisessig bei 60°C erfolgt durch Kondensation zum Thiohydantoinderivat die quantitative Abspaltung des um die N-terminale Aminosäure verkürzten Peptids. Die abgespaltenen Bruchstücke wurden ebenfalls UV-spektroskopisch quantitativ bestimmt (Tabelle 13). Im Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Eisessig/Wasser/n-Butanol 1:1:4) war nur ein Fleck des jeweiligen Spaltproduktes zu erkennen. Dieses Ergebnis schließt eine Chemisorption des ursprünglich zur Reaktion eingesetzten Peptids an das Copolymerisat eindeutig aus. Durch erneute Solvolyse mit konz. HCl bei 150°C im Bombenrohr wird das mit dem Polymeren gebildete Thiohydantoinderivat unter Freisetzung der ehemals endständigen Aminosäure gespalten. Die dünnschichtchromatographische Kontrolle dieser Reaktion ergab jeweils nur eine Aminosäure und zwar Glycin, was die Vollständigkeit der bei 60°C durchgeführten Hydrolyse beweist. Somit geben die %-Werte in Tabelle 13 die nach vollständiger Abspaltung wiedergefundenen Mengen Spaltprodukt an.

Tabelle 13

Bindungsvermögen des polymeren Isothiocyanates II für Peptide und
Spaltung der Peptidharze

gebundenes Peptid	gebundene Menge Peptid	bei 60°C in HCl/Eisessig aus 1g Harz abgespaltenes Produkt			
	$\left[\frac{\text{mMol pro}}{\text{mVal Harz}} \right]$	$\left[\frac{\text{mg pro}}{\text{1g Harz}} \right]$	$\left[\frac{\text{mg}}{\text{1g Harz}} \right]$	entspr. identifiziert % der Theorie	als
H-Gly-Tyr-OH	0,53	421	267	85	H-Tyr-OH
H-Gly-Phe-OH	0,56	408	312	100	H-Phe-OH
H-Gly-Tyr-Gly-OCH ₃	0,83	953	645	99,5	H-Tyr-Gly-OH
H-Gly-Phe-Gly-OH	0,94	997	636	92,5	H-Phe-Gly-OH

2.2.1.4. Umsetzung mit Proteinen

Zur Überprüfung der Reaktionsfähigkeit gegenüber Proteinen wurden die polymeren Isothiocyanate mit verschiedenen biologisch inaktiven Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichtes (Tabelle 14/15) umgesetzt. Ausgehend von den bei der Umsetzung der polymeren Isothiocyanaten mit Leucinamid gesammelten Erfahrungen sollten die Umsetzungen sowohl in 1n NaHCO_3 - als auch in 0,1n Na_2CO_3 -Lösung durchgeführt werden. Von den zur Verfügung stehenden Proteinen ließ sich jedoch nur Lactalbumin ohne Koagulation längere Zeit in 0,1n Na_2CO_3 -Lösung bei Zimmertemperatur aufbewahren, so daß das Bindungsvermögen der Polymeren mit den übrigen Proteinen nur in 1n NaHCO_3 -Lösung geprüft werden konnte. Lactalbumin, dessen Molekulargewicht von 17 000 dem des Papains (22 000) am nächsten kommt, wurde mit Harz I bis VII umgesetzt (Tabelle 14), wohingegen die restlichen Proteine nur mit den Harzen III und VI umgesetzt wurden (Tabelle 15).

Tabelle 14

Bindungsvermögen der polymeren Isothiocyanate für Lactalbumin

Harz Nr.	gebundene Menge Lactalbumin	
	bei Umsetzung in 1n NaHCO_3 -Lösung [mg/1g Harz]	bei Umsetzung in 0,1n Na_2CO_3 -Lösung [mg/1g Harz]
I	100	200
II	234	245
III	250	180
IV	70	70
V	380	340
VI	335	340
VII	50	50

Tabelle 15

Bindungsvermögen der polymeren Isothiocyanate III und VI für Proteine

Protein	Molekular- gewicht der Proteine (55)	gebundene Menge Protein bei der Umsetzung in 1n NaHCO ₃ -Lösung an	
		Harz III [mg/1g Harz]	Harz VI [mg/1g Harz]
Salmin	1000-5000	2060	2520
Myoglobin	16 900	200	150
Lactalbumin	17 900	250	335
Ovalbumin	44 000	-	-
Serumalbumin	69 000	-	-

Wie aus Tabelle 14 ersichtlich ist, sind die von Harz I bis VII gebundenen Lactalbuminmengen relativ gering. Es besteht kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Bindungsvermögen in 1n NaHCO₃- und 0,1n Na₂CO₃-Lösung. Die Erhöhung des Acrylsäure- sowie des Methacrylsäuregehaltes im Polymeren von ein auf zwei Mole pro Mol m-Isothiocyanatostyrol ist mit einer beträchtlichen Steigerung der gebundenen Menge Lactalbumin verbunden, wohingegen ein noch höherer Anteil der hydrophilen Komponenten im Polymeren keinen Einfluß auf die gebundenen Mengen Lactalbumin hat. Auffällig ist wiederum die geringe Reaktionsfähigkeit des Copolymerisates aus m-Isothiocyanatostyrol und Acrylsäureester des Diäthylenglykolmonomethyläthers (Harz VII).

Tabelle 15 zeigt eine Abnahme der gebundenen Proteinmengen mit steigendem Molekulargewicht der Proteine. Das Bindungsvermögen der polymeren Isothiocyanate gegen Papain (Molgewicht 22 000) ist dagegen, wie noch gezeigt wird, wesentlich höher als es nach den Werten in Tabelle 15 zu erwarten wäre.

Ein ähnliches Ergebnis fanden G. Manecke und H.J. Förster (14) bei der Untersuchung nitrierter Copolymerisate aus 4-Fluorstyrol und Methacrylsäure. Auch dieses reaktionsfähige Harz vermag mehr Papain als Lactalbumin zu binden. Der Unterschied im Bindungsvermögen dieses reaktionsfähigen Harzes für Salmin (650 mg/1g Harz) und Myoglobin (615 mg/1g Harz) ist aber wesentlich geringer als bei den Isothiocyanatharzen (Tabelle 15).

Berücksichtigt man weiterhin das hier beobachtete unterschiedliche Bindungsvermögen der nitrierten Copolymerisate aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid für die verschiedenen Enzyme, so läßt sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht der Enzyme und dem Bindungsvermögen des reaktionsfähigen Trägers für diese Enzyme feststellen. Während das nitrierte Copolymerisat aus Methacrylsäure/Methacrylsäure-m-fluoranilid nur 300-400 mg Trypsin, Molgewicht 23 800 (57), zu binden vermag, vermag es andererseits auch ca 300 mg Leucin-aminopeptidase, Molgewicht 300 000, aufzunehmen.

Auch die Bausteinanalyse der verschiedenen Enzyme und Proteine geben keinen näheren Aufschluß. Alle hier eingesetzten Proteine und Enzyme, mit Ausnahme des Salmins, besitzen einen relativ hohen Gehalt von ca. 14 % Glutamin- und Asparaginsäure. Auffällig ist der hohe Tyrosingehalt (14,3 %) des Papains. Ließe sich eventuell das hohe Bindungsvermögen der die Dinitrofluorphenylgruppe enthaltenden reaktionsfähigen Polymere hierauf zurückführen, so muß bei den Isothiocyanatharzen aber berücksichtigt werden, daß alkoholische und auch noch phenolische Hydroxylgruppen mit monomeren Isothiocyanaten wesentlich langsamer reagieren als Amine.

Diese Überlegungen deuten darauf hin, daß die sicherlich unterschiedlichen Sekundär- und Tertiärstrukturen der verschiedenen Proteine und Enzyme einen wesentlichen Einfluß auf die an reaktionsfähige Trägerharze zu bindenden Mengen haben.

2.3.1.5. Umsetzung mit Papain

Für die Umsetzung der polymeren Isothiocyanate mit Enzymen wurde aus den bereits in 2.2.1. geschilderten Gründen auch hier Papain eingesetzt.

Die Reaktion der polymeren Isothiocyanate I bis VII wurde in 1n NaHCO_3 -Lösung bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die dabei erzielten Umsätze sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16

Eigenschaften der Papainharze

Harz Nr.	gebundene Menge Papain [mg/1g Harz]	geb.Menge Papain desami- diert Mole Substrat	geb.Menge Papain desami- diert im gelösten Zustand Mole Substrat	geb.Menge Papain weist % Aktivität d.gelösten Papains auf
I	450 ⁺)	22,2 10^{-4}	16,3 10^{-4}	136
II	1500	175 10^{-4}	113 10^{-4}	155
III	1745	225 10^{-4}	131 10^{-4}	172
IV	330 ⁺)	5,75 10^{-4}	11,8 10^{-4}	48,7
V	1660	128 10^{-4}	125 10^{-4}	102
VI	2380	136 10^{-4}	179 10^{-4}	76
VII	100	2,5 10^{-4}	7,5 10^{-4}	33,4

⁺) Es mußten verschiedene Papainchargen verwendet werden, die stark unterschiedliche Aktivitäten aufwiesen (siehe Exp.Teil).

Ein Vergleich dieser Werte mit den in Tabelle 14 aufgeführten Bindungsvermögen für Lactalbumin läßt erkennen, daß pro 1 Gramm des zur Reaktion eingesetzten Harzes wesentlich mehr Papain als Lactalbumin gebunden wird. Weiterhin ist aus den in Tabelle 16 wiedergegebenen Werten eine deutliche Abhängigkeit der aufgenommenen Papainmengen von der Zusammensetzung der Harze zu erkennen, wobei Harz VI (Methacrylsäure-Copolymerisat) die höchste Menge Papain zu binden vermag. Wie aus den bisher mit Harz VII (Acrylsäureester-Copolymerisat) durchgeführten Reaktionen zu erwarten war, ist die gebundene Papainmenge von 100 mg pro 1g Harz sehr gering.

Verglichen mit dem bei den nitrierten Copolymerisaten aus Methacrylsäure/Methacrylsäure-m-fluoranilid eintretenden Verlust der Aktivität von ca. 50 % wird bei den Papainharzen IV bis VI (Methacrylsäure-Copolymerisate) eine etwas geringere Erniedrigung der Enzymaktivität beobachtet (Tabelle 16). Bei Harz V bleibt sogar die Enzymaktivität völlig erhalten.

Ein völlig anderes Verhalten lassen die Harze I bis III (Acrylsäure-Copolymerisate) erkennen (Tabelle 16). Einmal ist die Aktivität des gebundenen Papains, verglichen mit der gleichen Enzymmenge in Lösung, wesentlich höher, zum anderen ist die Steigerung der Aktivität deutlich abhängig vom Acrylsäuregehalt der Copolymerisate. Da in üblicher Weise die Aktivitätswerte durch Bestimmung des Umsatzes an Substrat nach konstanter Zeit ermittelt werden, wäre es möglich, daß die beobachteten unterschiedlichen Aktivitäten auf jeweils unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten der Enzym/Substrat-Reaktion beruhen. Zur näheren Untersuchung wurde daher die

Aktivität der Papainharze I bis III in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit auf das Substrat bestimmt.

Werden die nach der Reaktion der Harze mit α -N-Benzoyl-L-argininamid.HCl.H₂O gemessenen desamidierten Mole Substrat auf jeweils 100 mg am Harz gebundenes Papain bezogen, als Abszissenwerte über der Einwirkungszeit als Ordinatenwerte aufgetragen, so resultieren die in Abb.2 wiedergegebenen Geraden, deren verschieden starker Anstieg ein Maß für die unterschiedliche Aktivität der Harze I bis III darstellt. Es ist deutlich erkennbar, daß, je höher die Enzymaktivität der untersuchten Papainharze ist, umso steiler der Anstieg der Geraden verläuft.

Es muß vermutet werden, daß die bei Harz I, II und III beobachtete Erhöhung der Papainaktivität, verglichen mit der Aktivität einer entsprechenden Menge Papain in Lösung, auf eine höhere Geschwindigkeit der Enzym/Substrat-Reaktion am polymeren Träger beruht.

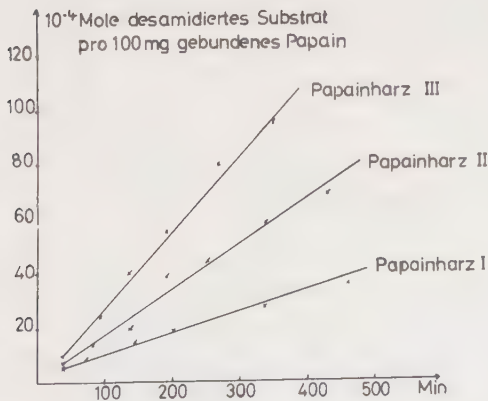


Abb. 2: Aktivität der Papainharze I bis III, bezogen auf 100 mg gebundenes Papain

Die gleiche Untersuchung wurde bei den Papainharzen IV bis VI durchgeführt. Bezieht man die desamidierten Mole Substrat wiederum auf 100 mg gebundenes Papain, so ergeben sich die in Abb. 3 dargestellten Geraden. Auch hier ist bei höherer Aktivität der Papainharze der Anstieg der Geraden steiler. Dagegen läßt sich kein klarer Zusammenhang zwischen der Enzym/Substrat-Reaktion der Papainharze aus den Acrylsäure-Copolymerisaten und denen aus den Methacrylsäure-Copolymerisaten erkennen.

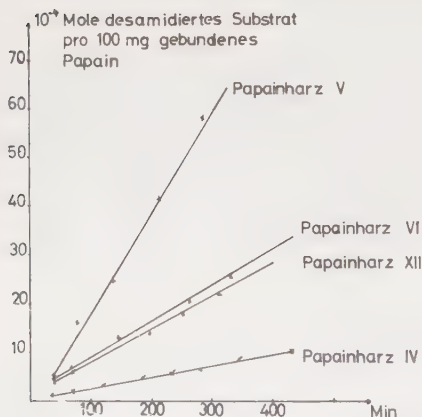


Abb. 3: Aktivität der Papainharze IV bis VI, bezogen auf 100 mg gebundenes Papain.

Die Beständigkeit der Papainharze wurde durch wiederholte Umsetzung derselben Harzprobe innerhalb von 14 Tagen mit dem Substrat geprüft. In Tabelle 17 sind die dabei erhaltenen Werte zusammengestellt. Die Beständigkeit der Aktivität der Papainharze aus den Acrylsäure-Copolymerisaten scheint größer zu sein als die der Papainharze aus den Methacrylsäure-Copolymerisaten.

Tabelle 17

Beständigkeit der Papainharze I bis VII

Harz Nr.	gebunde- ne Menge Papain [mg/l g] [Harz]	gebundene Menge Papain desamidiert nach 30 min. bei 37°C Mole·10 ⁻⁴ Substrat						% Akti- vität n.d.8. Umstzg. [%]		
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.		
				Umsetzung						
I	450 ⁺	15,8	21,2	22,2	21,5	21,9	20,0	19,0	18,0	80
II	1500	140,4	175	123	120	114	100	104	103	59
III	1745	216	279	225	216	184	173	168	180	82
IV	330 ⁺	5,7	5,75	4,65	4,30	4,18	3,76	4,2	3,22	56
V	1660	117	128	116	107	100	106	87	103	45
VI	2380	103	136	118	105	90	91	103	80	59
VII	100	2,5	2,4	2,42	2,2	2,0	1,9	1,6	1,43	53

⁺Es mußten verschiedene Papainchargen verwendet werden, die stark unterschiedliche Aktivitäten aufweisen (siehe Exp. Teil).

2.3.2. Vinylisothiocyanat-Copolymerisate

Das in Anlehnung an die Methode von G.D.Jones und R.L.Zimmermann (52) dargestellte Vinylisothiocyanat wurde mit Acrylsäure sowie Methacrylsäure im Molverhältnis 1:1 in Gegenwart von 50 Gew.% Benzin (Kp. 150-195°C) unter Zusatz von 1 Gew.% Vernetzer mit ABN unter Sauerstoffausschluß im Bombenrohr polymerisiert. Die Schwammstruktur der Copolymerisate blieb bei der analog zu 2.3.1. durchgeführten Extraktion der monomeren und niederpolymeren Anteile vollständig erhalten. Die Cyclohexanaufnahme des Acrylsäure-Copolymerisates betrug 660 mg pro 1g Harz, die des Methacrylsäure-Copolymerisates 500 mg pro 1g Harz. Die nach der Extraktion aus der Elementaranalyse berechnete Zusammensetzung der Copolymerisate ergab, daß unter den gewählten Copolymerisationsbedingungen nur ein Teil des eingesetzten Vinylisothiocyanates mit Methacrylsäure zu unlöslichen Harzen copolymerisiert worden war.

Beim Acrylsäure-Copolymerisat (Harz VIII) betrug das Molverhältnis Säure/Isothiocyanat ca. 1:1 und im Methacrylsäure-Copolymerisat (Harz IX) wurde ein Molverhältnis von ca. 2:1 gefunden.

Trotz makroskopischer Einheitlichkeit konnte auf Grund der durchgeführten Analysen nicht völlig ausgeschlossen werden, daß die extrahierten und zerkleinerten Proben uneinheitliche Zusammensetzung besitzen (Tabelle 18).

Die Reaktionsfähigkeit der Harze VIII und IX wurde wie die der Harze I bis VII durch Umsetzung mit n-Butylamin, Leucinamid, Lactalbumin und Papain geprüft (Tabelle 19).

Tabelle 18

Zusammensetzung der Harze VIII und IX

Harz Nr.	Molverh. d. gef. Zusammensetzung nach zur Polymen. der Extraktion der Poly- eingesetzt meren				gef. Zusammens. entspr. ca. Molverhältnis im Polymeren		berechnete Zusammensetzung			
	C	H	N	S			C	H	N	S
VIII	Acryls./ Vinyliso- thiocyanat 1:1				Acryls./ Vinylisothio- cyanat 1:1		49,0	5,82	8,15	18,6
IX	Methacryls./ Vinyliso- thiocyanat 1:1				Methacryls./ Vinylisothio- cyanat 2:1		51,0	6,55	5,40	12,3

Werden die nur näherungsweise bestimmbaren molaren Zusammensetzungen der Harze VIII und IX als exakt angesehen, so errechnet sich ein Isothiocyanatgruppengehalt von $58,2 \cdot 10^{-4}$ Mole pro 1g bei Harz VIII und $38,6 \cdot 10^{-4}$ Mole pro 1g bei Harz IX.

Tabelle 19

Reaktionsfähigkeiten der Harze VIII und IX

	Harz VIII	Harz IX
Zur Polymerisation einges. Monomere im Molverh. 1:1	Acryls./ Vinyliso- thiocyanat	Methacryls./ Vinyliso- thiocyanat
Nach der Extraktion vorlie- gende molare Zusammensetz.	ca 1:1	ca 2:1
berechneter Gehalt an Isothiocyanatgruppen [Mole/ 1g Harz]	$58,2 \cdot 10^{-4}$	$38,6 \cdot 10^{-4}$
gebundene Menge n-Butylamin [Mole/ 1g Harz]	$50 \cdot 10^{-4}$	$46 \cdot 10^{-4}$
gebundene Menge Leucinamid durch Umsetzung in 1n NaHCO_3 -Lösung [Mole/ 1g Harz]	$3,17 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-4}$
durch Umsetzung in 0,1 n Na_2CO_3 -Lösung (Mole/1g Harz)	$8,3 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-4}$
gebundene Menge Lactalbumin durch Umsetzung in 1 n NaHCO_3 -Lösung [mg/ 1g Harz]	71	89
durch Umsetzung in 0,1 n Na_2CO_3 -Lösung [mg/ 1g Harz]	100	60

Vergleicht man die mit Leucinamid erreichten Umsätze der Harze VIII und IX (Tabelle 19) mit diesen theoretischen Werten, so ergibt sich, daß nur ein relativ geringer Teil (5,5 % bei Harz VIII, 7,0 bei Harz IX) der Isothiocyanatgruppen in 1n NaHCO_3 -Lösung zur

Reaktion mit Leucinamid befähigt ist. Etwas höhere Prozentsätze, 14,3 % bei Harz VIII, 19,5 % bei Harz IX werden bei der Umsetzung in 0,1 n Na_2CO_3 -Lösung erreicht.

Damit sind die bei Harz VIII und IX absolut erreichten Umsätze mit Leucinamid sowie auch die prozentualen Anteile der zur Reaktion befähigten Isothiocyanatgruppen wesentlich geringer als bei den entsprechenden Copolymerisaten des m-Isothiocyanatostyrols. Dementsprechend gering sind auch die von Harz VIII und IX gebundenen Mengen Lactalbumin.

Die an Harz VIII und IX gebundenen Papainmengen konnten nicht bestimmt werden, da die nach der Umsetzung durchzuführende Eiweißbestimmung des im Waschwasser befindlichen Resteweißes erheblich gestört wurde. Es wurde im Waschwasser jeweils mehr "Eiweiß" bestimmt, als zur Reaktion mit den Harzen eingesetzt worden war.

Möglicherweise ist dieser Effekt auf im alkalischen Medium lösliche Anteile der Copolymerisate zurückzuführen.

Dagegen konnte die Aktivität der erhaltenen Papainharze durch wiederholte Umsetzung der gleichen Probe mit α -N-Benzoyl-L-argininamid.HCl.H₂O ohne Schwierigkeiten bestimmt werden (Tabelle 20).

Tabelle 20

Beständigkeit der Papainharze VIII und IX

Harz Nr.	Zur Umsetz. m. Papain einges. Harzmenge [mg]	Desamidierte Mole. 10^{-4} Sub- strat nach 30 Min Einwirkungs- zeit bei 37°C							
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
		Umsetzung							
VIII	100	9,3	9,6	9,6	8,2	8,4	7,8	7,2	6,4
IX	100	10,5	13,4	11,2	10,7	8,6	9,3	7,5	6,7

wie auch bei den bisher untersuchten Papainharzen tritt nach wiederholtem Umsatz mit dem Substrat ein Aktivitätsverlust ein, der mit dem der übrigen Papainharze vergleichbar ist.

Nimmt man an, daß die Aktivität des an Harz VIII und IX gebundenen Papains gleich der einer entsprechenden Menge Papain in wässriger Lösung ist, so beträgt die gebundene Papainmenge bei Harz VIII 270 mg pro 1 g Harz und bei Harz IX 310 mg pro 1 g Harz.

2.3.3. Polymere Isothiocyanate aus polymeren
primären Aminen

Neben der im Vorangegangenen beschriebenen Möglichkeit, polymere Isothiocyanate durch Polymerisation der entsprechenden Monomeren darzustellen, wurde als weiteres Syntheseprinzip auch die nachträgliche Einführung der Isothiocyanatgruppe in Polymere durch Umsetzung polymerer primärer Amine mit Thiophosgen angewendet.

Mit Lewatit CA 9119 der Farbenfabriken Bayer stand hierfür als Ausgangsprodukt ein schwach basischer Ionenaustauscher mit freien NH_2 -Gruppen und Schwammstruktur zur Verfügung. Des weiteren wurde schwach vernetztes Polystyrol durch Sulfonierung, Nitrierung und anschließende Reduktion der NO_2 -Gruppen in eine hydrophile Matrix mit primären Aminogruppen überführt. Copolymerisate aus m-Aminostyrol und hydrophilen Komponenten sowie Polyvinylamin wurden als weitere Ausgangsprodukte für die Darstellung polymerer Isothiocyanate verwendet. Die Umsetzung zu den Isothiocyanaten erfolgte bei Raumtemperatur in einem Chloroform/Wasser-Gemisch mit einem Überschuß an Thiophosgen. Die bei der Reaktion entstehende Salzsäure wurde mit Soda neutralisiert. Die so dargestellten Isothiocyanate wurden zur Entfernung der enthaltenen Na^+ und Cl^- Ionen der Elektrodialyse unterworfen. Die Prüfung der Reaktionsfähigkeit dieser polymeren Isothiocyanate erfolgte wie bei den bisher untersuchten Harzen durch Umsetzung mit n-Butylamin, Leucinamid, Lactalbumin und Papain.

2.3.3.1. Polymere Isothiocyanate aus Lewatit CA 9119 und aus sulfoniertem Polyamainostyrol

Das ursprünglich in Form eines Perlpolymerisates sehr unterschiedlicher Korngröße vorliegende Lewatit wurde vor der Umsetzung mit Thiophosgen gemahlen. Die Austauschkapazität der im weiteren verwendeten Kornfraktion (0,1-0,2 mm $\emptyset$) betrug $51,8 \cdot 10^{-4}$ Mole/1g Harz.

Das schwach vernetzte Polystyrol der Firma Serva wurde durch Sulfonierung mit Chlorsulfonsäure, Nitrierung in einem $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ -Gemisch und anschließende Reduktion der NO_2 -Gruppen mit Dithionit in ein hydrophiles

Polyaminostyrol überführt, dessen Gehalt an SO_3^- - und NH_2 -Gruppen sich aus den nach jeder Reaktionsstufe durchgeführten Analysen zu 0,5 Mole $-\text{SO}_3\text{H}$ und 1,5 Mole $-\text{NH}_2$ pro Phenylkern des Polystyrols errechnete (Tabelle 21).

Bei der sich anschließenden Umsetzung mit Thiophosgen wurden bei dem Styrolderivat (Harz XI) 66,6 % aller im Polymeren enthaltenen NH_2 -Gruppen zu Isothiocyanat umgesetzt (Tabelle 21), während sich bei Isothiocyanato-lewatit (Harz X) ein Gehalt von $29,8 \cdot 10^{-4}$ Mole Isothiocyanat pro 1 g Harz aus der Elementaranalyse ($\text{C} = 68,14 \%$; $\text{H} = 5,09 \%$; $\text{N} = 7,43 \%$; $\text{S} = 9,54 \%$) berechnen ließ.

Das Bindungsvermögen der Harze X und XI für n-Butylamin, Leucinamid, Lactalbumin und Papain ist in Tabelle 22 zusammengefaßt.

Mit n-Butylamin tritt bei den Harzen X und XI wie auch bei den bisher untersuchten polymeren Isothiocyanaten eine vollständige Umsetzung zu den Thioharnstoffderivaten ein.

Tabelle 21

Zusammensetzung des Harzes XI

Harz Nr.	am Polystyrol durchgeführte Reaktionen	gef. Zusammensetzung des umgesetzten Polystyrols				S	Zahl der funk- tionellen Grup- pen pro 2 Styrol- einheiten, ber. a.d. Analyse +		berechnete Zusammensetzung des Polymeren +			
		C	H	N					C	H	N	S
	Sulfonierung Nitrierung	39,83	3,35	8,21	6,41		3,0 NO ₂	1,0 SO ₃ H	39,0	4,25	8,15	6,28
	anschließende Reduktion	58,42	6,03	12,95	9,35		3,0 NH ₂	1,0 SO ₃ H	57,5	6,00	12,6	9,57
XI	anschließende Umsetzung mit Thiophosgen	44,01	3,82	7,92	19,00		1,0 NH ₂	1,0 SO ₃ H	43,6	5,85	8,48	19,4
							2,0 NCS					

+ Die gefundenen Prozentwerte für N und S lassen sich nur unter der Annahme von 2 Molen H₂O pro Styroleinheit im Polymeren mit den gefundenen C-Werten in Einklang bringen. Sauerstoff wurde nicht bestimmt.

Tabelle 22

Reaktionsfähigkeit der Harze X und XI

	Harz X	Harz XI
Zur Umsetzung mit Thiophosgen eingesetztes Produkt	Lewatit CA 9119	sulfoniert- tes Poly- aminosty- rol
berechneter Gehalt an Iso- thiocyanatgruppen [Mole/ 1g Harz]	29,8 10^{-4}	40,5 10^{-4}
gebundene Menge n-Butylamin [Mole/ 1g Harz]	35 10^{-4}	36,4 10^{-4}
gebundene Menge Leucinamid durch Umsetzung in 1n NaHCO_3 - Lösung [Mole/ 1g Harz]	15,6 10^{-4}	11,8 10^{-4}
durch Umsetzung in 0,1 n Na_2CO_3 -Lösung [Mole/ 1g Harz]	3,0 10^{-4}	18,7 10^{-4}
gebundene Menge Lactalbumin durch Umsetzung in 1n NaHCO_3 - Lösung [mg/ 1g Harz]	20	150
durch Umsetzung in 0,1 n Na_2CO_3 -Lösung [mg/ 1g Harz]	20	150
gebundene Menge Papain durch Umsetzung in 1n NaHCO_3 - Lösung [mg/ 1g Harz]	100	280

Bei den Reaktionen mit Leucinamid ergibt sich bei Harz XI ein 29 %iger Umsatz in 1n NaHCO_3 -Lösung, sowie ein 46,4 %iger Umsatz in 0,1n Na_2CO_3 -Lösung. Die an Harz XI gebundene Menge Leucinamid entspricht etwa der Menge, die vom Harz III aufgenommen wird. Vergleicht man aber die jeweils gebundenen Mengen Lactalbumin, so liegen diese Werte bei Harz XI wesentlich niedriger als bei Harz III.

Dementsprechend gering ist auch die an Harz XI gebundene Papainmenge.

Das Bindungsvermögen des Harzes X gegen Leucinamid, Lactalbumin und Papain liegt noch unter dem des Harzes XI. Ebenso unbefriedigende Ergebnisse resultierten bei der Aktivitätsbestimmung der Papainharze.

Bei der ersten Umsetzung des Papainharzes XI mit dem Substrat werden innerhalb von 30 Minuten von 1g Harz noch $4,86 \cdot 10^{-4}$ Mole Substrat desamidiert, während bei der zweiten Umsetzung diese Aktivität bereits auf $2,05 \cdot 10^{-4}$ Mole desamidiertes Substrat absinkt. Nach der sechsten Einwirkung des Substrates auf das Papainharz XI sind nur noch 10 % der ursprünglichen Aktivität nachweisbar, was auf eine Chemisorption des Papains an diesem Harz hindeutet. Zieht man zum Vergleich der Aktivität des gebundenen Papains mit der einer gleichen Papainmenge in Lösung den nach der zweiten Umsetzung mit dem Substrat erhaltenen Aktivitätswert heran, so bleibt die Aktivität des Papains bei der Reaktion mit dem Harz XI nur zu 25 % erhalten. Das Papainharz X zeigt keine Enzymaktivität.

2.3.3.2. Polymere Isothiocyanate aus einem m-Aminostyrol/Methacrylsäure-Copolymerisat und aus Polyvinylamin

m-Aminostyrol wurde mit Methacrylsäure im Molverhältnis 1:1 in Gegenwart von 50 Gew. % Benzin (Kp. 150-195°C) und 1 Gew.% DVB als Vernetzer mit ABN unter Sauerstoffausschluß im Bombenrohr polymerisiert.

Die Schwammstruktur und auch die molare Zusammensetzung des Copolymerisates blieb nach der analog 2.2. durchgeführten Extraktion mit Methanol erhalten.

Die Cyclohexanaufnahme des Copolymerisates betrug 300 mg pro 1 g Harz.

Da sich die Reinigung durch Extraktion mit Methanol bei der späteren Umsetzung des aus diesem Copolymerisat dargestellten Isothiocyanates mit Proteinen und Enzymen als nicht ausreichend erwies, wurde das Copolymerisat zur Entfernung aller im alkalischen Medium löslichen Anteile mit 1n NaOH behandelt. Bei der nachfolgenden Umsetzung mit Thiophosgen wurden ca. 100 % aller im Molekül vorhandenen NH_2 -Gruppen zu Isothiocyanat (Harz XII) umgesetzt (Tabelle 23).

Ein analog dargestelltes Copolymerisat aus Acrylsäure und m-Aminostyrol konnte weder mit Thiophosgen in ein Isothiocyanat überführt werden, noch ließ es sich diazotieren und kuppeln. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, daß das Polymere in einer Struktur vorliegt, in der die NH_2 -Gruppen unter den beschriebenen Bedingungen nicht reaktionsfähig sind.

Um ein zur Darstellung eines hydrophilen Polyvinylisothiocyanates geeignetes Polyvinylamin zu erhalten, wurde beim Schmidt'schen Abbau der Polyacrylsäure nach H.Roth und E.Hilscher (56) eine kurzkettige, unvernetzte Polyacrylsäure ($\eta = 1600 \frac{\text{cm}^3}{\text{g}}$ bei $c = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ und 25°C) eingesetzt und deren Carboxylgruppen nur zu ca. 40 % mit N_3H zu NH_2 -Gruppen umgesetzt. Das Hydrochlorid dieses Polyvinylamins zeigt eine Viskositätszahl von $1000 \frac{\text{cm}^3}{\text{g}}$ bei einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ g/cm}^3$ und 25°C .

Die Umsetzung mit Thiophosgen führte zu einem wasserunlöslichen aber quellbaren Produkt mit freien Isothiocyanatgruppen. In der Annahme, daß bei der Umsetzung mit Thiophosgen keine Thioharnstoffderivate gebildet wurden, läßt sich aus den Werten der Elementaranalyse ein Molverhältnis von Vinylisothio-

cyanat- zu Vinylamin- zu Acrylsäureeinheiten
von 1:0,7:1,5 in diesem Polymeren (Harz XIII)
errechnen (Tabelle 23).

Die an Harz XII und XIII erzielten Umsätze mit
n-Butylamin, Leucinamid und Lactalbumin sind in
Tabelle 24 zusammengefaßt.

Zusammensetzung der Harze XII und XIII

Harz Nr.	zur Polymeri- sation ein- gesetztes Molverhältnis	nach der Umsetzung mit Thiophosgen gef. Zu- sammensetzung	C	H	N	S	ca. molare Zusam- mensetzung d. polym. Produktes	berechnete Zusammensetzung					
							C	H	N	S			
XII	Methacryls./ m-Aminostyrol 1:1	60,03	5,79	4,90	12,39		Methacryls./ m-Aminostyrol 1,25:1 bei 100% Umsatz zu Isothiocyanat	63,0	5,90	5,25	12,0		
Harz Nr.	an Polyacryls. durchgeführte Reaktionen	gef. Zusammensetzung d. Reaktionsproduktes	C	H	N	S	Cl	ca. molare Zusam- mensetzung d. polym. Produktes	C	H	N	S	Cl
XIII	Umsetzung mit N ₂ H anschließen- de Umsetzung mit Thio- phosgen	37,85	6,52	6,72	-	14,09		Äthylamin·HCl zu Propions. wie 1:1,5 Äthylamin zu Propions. zu Äthylisothio- cyanat wie 0,7:1,5:1,0	38,0	5,85	6,82	-	17,1
		49,52	5,87	10,50	14,00	-			48,0	5,60	10,7	13,9	-

Tabelle 24

Reaktionsfähigkeit der Harze XII und XIII

	Harz XII	Harz XIII
Zur Umsetzung mit Thiophogen eingesetzte Produkte	Methacryl- säure/m- Aminostyrol Molv. 1:1	Polyvinyl- amin
berechneter Gehalt an Iso- thiocyanatgruppen [Mole/ 1g Harz]	37,4 10^{-4}	44,8 10^{-4}
gebundene Menge n-Butylamin [Mole/ 1g Harz]	74,4 10^{-4}	52,0 10^{-4}
gebundene Menge Leucinamid durch Umsetzung in 1n NaHCO_3 - Lösung [Mole/ 1g Harz]	16,2 10^{-4}	12,0 10^{-4}
durch Umsetzung in 0,1 n Na_2CO_3 -Lösung [Mole/ 1g Harz]	18,4 10^{-4}	15,8 10^{-4}
gebundene Menge Lactalbumin durch Umsetzung in 1n NaHCO_3 - Lösung [mg/ 1g Harz]	20-50	100
durch Umsetzung in 0,1 n Na_2CO_3 -Lösung [mg/ 1g Harz]	20-50	130

Legt man jeweils die aus der Elementaranalyse errechnete Zusammensetzung der Harze zu Grunde, so ergibt sich für Harz XII ein ca. 46 %iger Umsatz mit Leucinamid und für Harz XIII ein ca. 33 %iger Umsatz, wobei weder bei Harz XII noch bei Harz XIII ein wesentlicher Unterschied zwischen der Reaktionsfähigkeit in 1n NaHCO_3 - und 0,1 n Na_2CO_3 -Lösung festzustellen ist.

Während die Umsetzung mit Leucinamid in ähnlicher Größenordnung wie bei den übrigen Isothiocyanaten verläuft, sind die von Harz XII und XIII gebundener

Mengen Lactalbumin relativ gering.

Das Papainbindungsvermögen der Harze XII und XIII sowie die Beständigkeit der Papainharze sind in Tabelle 25 zusammengestellt.

Tabelle 25

Eigenschaften der Papainharze XII und XIII

Harz Nr.	gebundene Menge Papain mg/1g Harz	geb.Menge Papain desamidiert im gel.Zust. Mole Substrat	gebundene Menge Papain desamidiert Mole 10^{-4} Substrat in 30 Min. bei 37°C					
			1.	2.	3.	4.	5.	6.
XII	300	$10,8 \cdot 10^{-4}$	10,8	11,6	11,1	10,2	10,2	9,35
XIII	230	$8,3 \cdot 10^{-4}$	7,3	5,0	5,2	3,7	3,0	4,2

Ein Vergleich des Harzes XII mit dem des entsprechenden Copolymerisates aus Methacrylsäure und m-Isouthiocyanatostyrol (Harz IV) zeigt, daß zwar etwa die gleichen Mengen Papain gebunden werden, die Aktivitäten der Papainharze aber sehr unterschiedlich sind.

So bleibt die Aktivität des an Harz IV gebundenen Papains im Vergleich zu einer entsprechenden Menge Papain in Lösung zu 48,2 % erhalten, während bei Harz XII kein Aktivitätsverlust auftritt.

Bereits bei der Untersuchung der Papainharze I bis III und IV bis VI war eine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Papainharz-Substrat-Reaktion von der Harzzusammensetzung beobachtet worden (Abb. 2 u.3). Wird auch bei Papainharz XII die desamidierte Substratmenge in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit

des Papainharzes auf das Substrat bestimmt und werden diese Werte auf 100 mg gebundenes Papain bezogen, so hat die resultierende Gerade (Abb.3) einen steileren Anstieg als die des Papainharzes IV, was mit der höheren Aktivität des Papainharzes XII in Übereinstimmung steht.

Die Gerade für Papainharz XII zeigt aber einen flacheren Anstieg als die für Papainharz VI, dessen Aktivität 76 %, bezogen auf die Aktivität der gebundenen Papainmenge im gelösten Zustand, beträgt.

Diese Ergebnisse können nur auf eine Einflußnahme der Matrix auf die Enzym-Substrat-Reaktion zurückgeführt werden. Da es sich bei der Papainharz-Substrat-Reaktion um eine zwischen flüssiger und fester Phase verlaufende Reaktion handelt, deren Geschwindigkeit stark vom Stofftransport durch Grenzflächen beeinflußt wird, müssen die Ursachen für das unterschiedliche Aktivitätsverhalten der gebundenen Enzyme in den verschiedenen Porenstrukturen der Polymeren, einer unterschiedlichen Solvation, einer möglicherweise sterischen Hinderung von Reaktionsübergangszuständen und einer eventuell auch durch die unterschiedlichen pK-Werte der eingesetzten Säuren und durch eine unterschiedliche Folge der Comonomeren in der polymeren Matrix bedingten verschiedenen Mikroumgebung der gebundenen Enzyme zu suchen sein. Inwieweit einzelne Effekte oder das Zusammenwirken der genannten Parameter die makroskopisch meßbaren Ergebnisse verursachen, ist mit dem erarbeiteten Material nicht zu entscheiden.

Abweichend vom Verhalten der bisherigen Papainharze bleibt die Aktivität des Papainharzes XII auch nach sechsmaliger Umsetzung der Probe mit Δ -N-Benzoyl-L-argininamid.HCl.H₂O fast vollständig erhalten (Tab.25).

Die von Harz XIII gebundene Papainmenge ist mit 230 mg pro 1g Harz relativ gering. Verglichen mit der Aktivität der gleichen Menge Papain in Lösung beträgt die Aktivität des Papainharzes 88 %.

2.4. Wasserunlösliches, vernetztes Papain

Neben der Darstellung von Enzymderivaten durch kovalente Bindung der Enzyme an polymere reaktionsfähige Träger wurden verschiedentlich auch Enzymderivate durch Vernetzung mit bifunktionellen Verbindungen erhalten. Bei der Reaktion von p.p'-Difluor-m.m'-dinitrodiphenylsulfon (58), Bis-diazobenzidin (59), Bis-diazohexan (60), N.N'-(1.2-phenylen-bis-maleinimid) (61) und Phenol-2.4.-disulfonylchlorid (61) mit Enzymen wurden wasserunlösliche Enzymderivate erhalten.

Zur Untersuchung, inwieweit bifunktionelle Isothiocyanate zur Bildung wasserunlöslichen Papains befähigt sind, wurde die mit Thiophosgen umgesetzte 2.2'-Benzidindisulfonsäure mit Papain in wässrig bikarbonathaltiger Lösung bei Zimmertemperatur versetzt. Die dabei entstehenden geringen, sehr voluminösen Niederschläge wurden abzentrifugiert und die Menge sowie die Aktivität der verschiedenen Proben bestimmt. Die Ausbeute des wasserunlöslichen Derivates, bezogen auf die eingesetzte Papainmenge, betrug 3,4 Gew.%. Die Aktivität einer 30 mg Probe ist in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26

Eigenschaften des vernetzten Papains

Wiederholte Umsetzung einer 30 mg Probe Papain- derivat mit Substrat	desamidierte Mole α -N-Benzoyl-L-argi- ninamid.HCl.H ₂ O in 30 Min. bei 37°C	desamidierte Menge Substrat entspricht der Aktivität von mg gelöstem Papain
1.	10,6 10^{-4}	133
2.	11,6 10^{-4}	
3.	10,4 10^{-4}	
4.	8,7 10^{-4}	

Die Ausbeute an wasserunlöslichem Produkt ist äußerst gering, Die Aktivität der Probe ist dagegen mit der 4,4-fachen Aktivität, bezogen auf die einer gleichen Papainmenge im gelösten Zustand, sehr hoch.

Bei der Beurteilung dieses Phänomens muß berücksichtigt werden, daß das verwendete Papain nicht als kristallisiertes Produkt, sondern als Papain prakt. vorlag. Es muß daher offen bleiben, ob die beobachtete Aktivitätserhöhung auf eine Beeinflussung der Enzym/Substrat-Reaktion zurückzuführen ist oder ob es sich lediglich um eine selektive Abtrennung des schwer löslichen Papainderivates von den inaktiven Bestandteilen des eingesetzten Rohpapains handelt.

3. Zusammenfassung

Die Verwendungsfähigkeit eines bereits bekannten nitrierten Copolymerisates aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid zur Darstellung von Enzymharzen wurde durch die Umsetzung dieses reaktionsfähigen Harzes mit Enzymen verschiedener Spezifität untersucht.

Das reaktionsfähige Hochpolymere vermag 206 mg Cellulase (Carbohydase), 230 - 280 mg Leucinaminopeptidase (Peptidase), 300 - 400 mg Trypsin und 1100 mg Papain (Proteinasen) pro 1 g zur Reaktion eingesetztes Harz zu binden.

Vergleicht man die an den Enzymharzen bestimmten Aktivitäten mit denen der gebundenen Enzymmengen im gelösten Zustand, so weist das Papainharz 50 %, das Leucinaminopeptidaseharz 15 % Enzymaktivität auf. Trypsin und Dextranase werden sowohl vom Polymeren als auch von 2,4-Dinitrofluorbenzol fast vollständig deaktiviert. Dagegen konnte die geringe Enzymaktivität des Cellulaseharzes (0,2 %) auf eine selektive Bindung von inaktiven Eiweißprodukten aus der zur Verfügung stehenden Rohcellulase zurückgeführt werden.

An dem bereits bekannten Diastaseharz wurde der Einfluß von pH-Änderungen auf die Enzymaktivität der gebundenen Diastase untersucht, wobei zwar keine Veränderung des Aktivitätsmaximums der gebundenen Diastase im Vergleich zu der gelösten Diastase, aber eine größere Stabilität der gebundenen Diastase gegenüber Alkali nachgewiesen werden konnte.

Das nitrierte Copolymerisat aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid wurde mit von 1 bis 9 % steigendem Vernetzergehalt als Schwammpolymeres synthetisiert und das Bindungsvermögen der Harze für Papain untersucht. Es läßt sich dabei eine Abhängigkeit vom Vernetzergehalt erkennen. Vermag 1 g des 1 % Vernetzer enthaltenden Harzes 3500 mg bis 2830 mg Papain zu binden, so sinkt bei einer Erhöhung des Vernetzergehaltes auf 2 % die zu bindende Papainmenge auf 1860 mg Papain pro 1 g Harz ab. Eine weitere Erhöhung des Vernetzergehaltes hat ein durchschnittliches Bindungsvermögen von 1000 mg bis 1300 mg Papain pro 1 g zur Reaktion eingesetztes Harz zur Folge, was in etwa dem Bindungsvermögen des nitrierten Copolymerisates ohne Schwammstruktur entspricht. Eine Veränderung der Enzymaktivität im Vergleich zu der des Papainharzes aus dem nitrierten Copolymerisat ohne Schwammstruktur ist nicht erkennbar.

Neue reaktionsfähige Harze wurden durch Darstellung isothiocyanatgruppenhaltiger Polymere gewonnen, deren Bindungsvermögen in wässrig-alkalischen Medien untersucht wurden.

Es wurden

1. m-Isothiocyanatostyrol mit Acrylsäure, Methacrylsäure bzw. dem Acrylsäureester des Diäthylenglykolmonomethyläthers als Schwammpolymeres in verschiedenen Molverhältnissen copolymerisiert.
2. Vinylisothiocyanat mit Acrylsäure bzw. Methacrylsäure als Schwammpolymeres copolymerisiert.
3. Lewatit CA 9119 mit Thiophosgen zu dem Isothiocyanat umgesetzt.
4. Ein nitriertes, sulfoniertes und reduziertes Polystyrol mit Thiophosgen in das Isothiocyanat überführt.

5. m-Aminostyrol mit Methacrylsäure als Schwamm copolymerisiert und mit Thiophosgen umgesetzt.
6. Polyvinylamin synthetisiert und mit Thiophosgen umgesetzt.

Die Reaktionsfähigkeit der Isothiocyanatharze wurde durch Umsetzung mit n-Butylamin, Leucinamid, Lactalbumin und Papain geprüft.

Die Isothiocyanatharze reagieren mit n-Butylamin quantitativ zu den Thioharnstoffderivaten, wohingegen die Umsetzung mit Leucinamid, die in 1n NaHCO_3 -Lösung und 0,1n Na_2CO_3 -Lösung durchgeführt wurde, maximal 90 % (Harz I), minimal zu 5 % (Harz VII) Umsatz führt. [Zusammensetzung der Harze I bis VII Seite 35]

Ein Beweis für die kovalente Bindung von Peptiden an die Isothiocyanatharze konnte durch die Ausführung des Edman Abbaues an mit Di- und Tripeptiden umgesetztes Harz II erbracht werden.

Lactalbumin (Molgewicht 17 000) wird von den Isothiocyanatharzen relativ wenig gebunden, 380 mg pro 1 g zur Reaktion eingesetztes Harz V ist der höchste erreichte Wert.

Das bei Harz III und VI untersuchte Bindungsvermögen für Proteine verschiedenen Molgewichtes zeigt eine deutliche Abhängigkeit von diesem. So werden 2060 mg bis 2520 mg Salmin (Molgewicht 1000-5000) pro 1 g zur Reaktion eingesetztes Harz gebunden, während von Myoglobin (Molgewicht 16 900) und Lactalbumin (Molgewicht 17 000) nur ca. 200 mg pro 1 g Harz gebunden werden. Proteine mit höherem Molgewicht werden nicht aufgenommen.

Daß neben dem Molgewicht noch andere Faktoren für die an die Copolymerisate zu bindenden Proteinmengen

verantwortlich sind, zeigt sich an dem hohen Bindungsvermögen der Harze für Papain (Molgewicht 22 000). Das höchste Bindungsvermögen für Papain zeigen die m-Isothiocyanatostyrol-Copolymerisate (Harz I-VI), wobei mit steigendem Gehalt an Acrylsäure und Methacrylsäure die zu bindende Papainmenge zunimmt und bei Harz VI mit 2380 mg pro 1 g Harz die höchsten Werte erreicht.

Papainharze, hergestellt aus m-Isothiocyanatostyrol/Acrylsäure-Copolymerisaten, zeigen eine scheinbar höhere Enzymaktivität als die gebundenen Mengen Papain in Lösung aufweisen würden. Mit steigendem Gehalt an Acrylsäure nimmt die Enzymaktivität dieser Papainharze zu. Die analogen Papainharze aus den Methacrylsäure-Copolymerisaten zeigen eine geringere oder gleiche Aktivität im Vergleich zu der Aktivität der jeweils gebundenen Papainmenge im gelösten Zustand.

Papain Harz XII (m-Aminostyrol/Methacrylsäure Copolymerisat mit Thiophosgen umgesetzt, Molverhältnis 1:1) weist eine höhere Aktivität auf als das Papainharz IV (m-Isothiocyanatostyrol/Methacrylsäure Copolymerisat, Molverhältnis 1:1).

Die Ursachen dieses Verhaltens werden auf eine Beeinflussung der Enzymharz-Substrat-Reaktion durch die Matrix zurückgeführt.

Bei der Reaktion des Papains mit dem Isothiocyanat der 2.2'-Benzidindisulfonsäure wurde ein wasserunlösliches aktives Papainderivat erhalten.

4. Experimenteller Teil

4.1. Allgemeine Bestimmungsmethoden

4.1.1. Eiweißbestimmung nach D. Pressmann (63)

Folin-Reagenz: 50 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12,5 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 25 ml 85 proz. Phosphorsäure werden in 350 ml H_2O gelöst, mit 50 ml konz. HCl versetzt und 10 Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen werden 75 g Li_2SO_4 , 25 ml H_2O und einige Tropfen Brom hinzugefügt. Nach dem Verkochen des überschüssigen Brom wird die Lösung in einem Meßkolben auf 500 ml aufgefüllt. Das Reagenz wird 1:2 mit H_2O verdünnt und mit konz. HCl auf die Normalität 1 eingestellt benutzt.

Durchführung der Bestimmung: In 25 ml Meßkölbchen werden 2,5 ml 1n NaOH und 1-4 ml Eiweißlösung gegeben. Das Reaktionsvolumen wird mit H_2O auf 7,5 ml aufgefüllt, die Kölbchen genau 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, danach im Eisbad rasch abgekühlt, 2,5 ml Folin-Reagenz hinzugefügt und mit H_2O auf 25 ml aufgefüllt. Nach genau 10 Minuten, von der Zugabe des ersten Tropfen Folin-Reagenz an gerechnet, wird die Extinktion der Lösung im Colorimeter nach Kortüm in Küvetten der Schichtdicke 1 cm und dem Filter RG2 gemessen.

4.1.2. Eiweißbestimmung nach O.H. Lowry et.al. (64)

Lösungen:

A: 0,1 n NaOH , die 2 proz. Na_2CO_3 enthält.

B: 500 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ werden in ca 50 ml H_2O gelöst, 1 g K-Na-Tartrat zugegeben, mit 1 n NaOH auf pH 8 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt.

C: 100 ml Lösung A werden mit 2 ml Lösung B vor der Durchführung der Bestimmung gemischt.

Ausführung: In einem 50 ml Becherglas werden 10 ml der Lösung C mit 1-4 ml Eiweißlösung und 1-4 ml H_2O (H_2O +Eiweißlösung jeweils 4 ml) gut vermischt und genau 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach werden 2 ml Folin-Reagenz hinzugefügt und nach genau 30 Minuten die Extinktion der Lösung entweder im Colorimeter nach Kortüm mit dem Filter RG2 oder im Beckman-Spektralphotometer DB bei 650 $m\mu$ gemessen.

Der arithmetische Mittelwert aus 6 Einzelbestimmungen wurde als Meßwert benutzt.

4.1.3. Eiweißbestimmung nach A.G.Gornall mit dem Biuret-Reagenz (65)

Biuret-Reagenz: 1,5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ und 6 g K-Na-Tartrat werden in 500 ml H_2O gelöst, 300 ml 10 proz. NaOH-Lösung hinzugegeben, unter gutem Umschütteln 2 g KJ hinzugefügt und auf genau 2 l aufgefüllt. Die Lösung ist mehrere Wochen haltbar.

Ausführung der Bestimmung: 3 ml Eiweißlösung werden mit 12 ml Biuret-Reagenz gemischt und nach genau 30 Minuten die Extinktion der Lösung im Beckman-Spektralphotometer DB bei 560 $m\mu$ in Küvetten mit 2 cm Schichtdicke gemessen.

4.1.4. Aktivitätsbestimmung der Diastase

In Anlehnung an die Methode von R. Willstätter (41) et.al. werden 1-4 ml einer 0,1 proz. Diastase-Lösung mit 25 ml einer 1 proz. Stärkelösung, 10 ml Phosphatpuffer (5,1 ml 0,2 m $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ + 4,9 ml 0,2 m $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) und 1 ml 0,2 m NaCl-Lösung versetzt und 30 Minuten bei 37°C temperiert.

Danach wird die Reaktion mit 2 ml 1 n HCl abgestoppt, 10 ml 0,1 n Jodlösung und 60 ml 0,1 n NaOH zur Oxydation des gebildeten Zuckers hinzugefügt, nach 10 Minuten mit 10 ml 10 proz. H_2SO_4 angesäuert und

mit 0,1n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ das überschüssige Jod zurücktitriert.
1 ml 0,1n Jodlösung $\cong$ 17,15 mg Maltose
1 mg der eingesetzten Diastase bildet in 30 Minuten
bei 37°C aus einer 1 proz. Stärkelösung 92,4 mg
Maltose.

4.1.5. Aktivitätsbestimmung der Cellulase

Kupfer-Reagenz nach Somogyi (66): 28 g wasserfreies Na_2HPO_4 und 40 g Seignettsalz werden in 700 ml H_2O gelöst, 100 ml 1n NaOH hinzugefügt, unter Rühren mit 80 ml 10 proz. CuSO_4 -Lösung versetzt, 180 g Na_2SO_4 (wasserfrei) hinzugegeben und bis zur vollständigen Lösung des Na_2SO_4 gerührt. Nach Zugabe von 25 ml 1n KJO_3 -Lösung wird auf 1 l aufgefüllt und nach zweitägigem Stehen filtriert.

Ausführung der Bestimmung: In Anlehnung an die Methode von M.J.Wolf (43) et al. werden 1-10 mg Cellulase mit 20 ml einer 1 proz. Carboxymethylcellulose-Lösung (CMC-Lösung) und 5 ml 0,2 m Na-Acetatpuffer 60 Minuten bei 37°C temperiert. Die sich anschließende Bestimmung der gebildeten Glucose nach Somogyi mit dem Kupfer-Reagenz in offenen Gefäßen ergab keine reproduzierbaren Ergebnisse. Deshalb wird die Oxydation in der abgebildeten Apparatur ausgeführt.

In den Erlenmeyer-Kolben werden genau 10 ml der glucosehaltigen CMC-Lösung überführt, mit 3 ml Kupfer-Reagenz versetzt, die Apparatur über den leichten Luftballon mit Stickstoff gefüllt, die geschlossene Apparatur 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, kurz abgekühlt und über den Tropftrichter nacheinander 2 ml 2,5 proz. KJ-Lösung und



2 ml 2 n H_2SO_4 hinzugegeben, gut vermischt und nach 10 Minuten das überschüssige Jod mit 0,01 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ titriert. Der Jodgehalt des Kupfer-Reagenzes sowie der Blindwert der CMC-Lösung werden bestimmt. Da die Umsetzung der gebildeten Glucose mit dem Kupfer-Reagenz nicht stöchiometrisch verläuft, wird eine Eichkurve mit einer 0,1 proz. Glucose-Lösung aufgenommen.

1 mg der eingesetzten Cellulase bildet in 60 Minuten bei 37°C aus einer 1 proz. CMC-Lösung 1,84 mg Glucose.

4.1.6. Aktivitätsbestimmung des Trypsins

Zu 10 ml einer 2,5 proz. Hämoglobinlösung pH 7,5 werden in Anlehnung an die Methode von M.L. Anson (67) 1-5 ml Trypsinlösung gegeben und 20 Minuten bei 30°C gehalten. Mit 25 ml 0,3 m Trichloressigsäure wird danach das unverdaute Eiweiß ausgefällt und der Niederschlag abzentrifugiert. Zur Bestimmung des abgespaltenen Tyrosins werden 5 ml der überstehenden Lösung mit 10 ml 0,5 n NaOH versetzt, auf 30°C erwärmt und genau 5 Minuten nach der Zugabe von 3 ml Folin-Reagenz die Extinktion der Lösung im Colorimeter nach Kortüm (Filter RG2) gemessen. Der Blindwert des Hämoglobins wird vor jeder Messung bestimmt. Mit einer 0,01 proz. Tyrosinlösung, die 0,2 n an HCl ist, wird eine Eichkurve aufgenommen.

1 mg des eingesetzten Trypsin bildet in 20 Minuten bei 30°C aus 10 ml Hämoglobinlösung 0,352 mg Tyrosin.

4.1.7. Aktivitätsbestimmung der Leucinaminopeptidase

In Anlehnung an die Methode von R.L. Hill und D.H. Spackman (68) werden 1 - 7 mg Leucinamino-peptidase in 3 ml H_2O gelöst, mit 1,6 ml 0,025 m $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ -Lösung 30 Minuten bei $37^\circ C$ aktiviert, danach mit 2 ml 0,5 m Trispuffer pH 8,3 und 8 ml 0,1 m L-Leucinamid $\cdot HCl$ -Lösung, die mit 1 n NaOH auf pH 8,3 eingestellt wird, versetzt. Nach 60 Minuten Einwirkungszeit bei $37^\circ C$ werden 5 ml abpipettiert, mit 10 ml neutralisiertem Formalin versetzt und unter N_2 in der abgebildeten Apparatur mit 0,02 n NaOH gegen Phenolphthalein titriert.



1 mg der eingesetzten Leucinaminopeptidase desamidiert in 60 Minuten bei $37^\circ C$ $1,45 \cdot 10^{-4}$ Mol L-Leucinamid.

4.1.8. Aktivitätsbestimmung der Dextranaccharase (69)

Die Dextranaccharase stand in Form einer Suspension in 0,05 m Na-Acetatpuffer pH 5,2-5,3 zur Verfügung.

Sumner-Reagenz: 10 g 3,5-Dinitrosalicylsäure, 300 g Seignettsalz und 16 g NaOH werden in 600-700 ml H_2O bis zur vollständigen Lösung gerührt

und auf 1 l aufgefüllt. Nach zweitägigem Stehen im Dunklen wird die Lösung filtriert und in einer dunklen Flasche aufbewahrt.

Ausführung der Bestimmung: Zu 20 ml 5 proz. Saccharase-Lösung in 0,05 m Na-Acetatpuffer pH 5,2 - 5,3 werden 1-2 ml der 1 : 50 verdünnten Enzymsuspension hinzugefügt und 60 Minuten auf 25°C erwärmt. 1-4 ml der Lösung werden abpipettiert, in einen 25 ml Meßkolben überführt, mit 3 ml Sumner-Reagenz versetzt, mit H₂O auf 12 ml aufgefüllt und 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen unter fließendem Wasser wird auf 25 ml mit H₂O aufgefüllt und die Extinktion der Lösung im Colorimeter nach Kortüm bei 530 m μ (Filter OG1) gemessen. Es wird der Blindwert der Saccharase-Lösung bestimmt sowie eine Eichkurve mit einer 0,1 proz. Fructose-Lösung aufgenommen. 1 ml der eingesetzten Dextranaccharase-Lösung bildet in 60 Minuten bei 25°C 2,5 mg Fructose.

4.1.9. Aktivitätsbestimmung des Papains

Die Bestimmung wird in Anlehnung an die Methode von J.R.Kimmel und E.L.Schleith durchgeführt (46).

1-10 mg Papain in 1-3 ml H₂O gelöst werden mit 0,5 ml 0,1 m Cystein.HCl (mit 1n NaOH auf pH 5,1 eingestellt) versetzt und 20 Minuten bei 37°C aktiviert. Nach Zugabe von 1 ml 0,02 m Phosphatpuffer pH 5,1 und 4 ml 0,1 m L-N-Benzoyl-L-argininamid.HCl.H₂O (auf pH 5,1 eingestellt) wird genau 30 Minuten bei 37°C temperiert, mit 10 ml

neutralisiertem Formalin versetzt und mit 0,02 NaOH gegen Phenolphthalein die gebildete freie Aminosäure, wie in 4.1.7. beschrieben, titriert. Der Blindwert der Reaktionslösung wird vor jeder Messung bestimmt.

Bei den Umsetzungen mit Papain mußten verschiedene Enzymchargen mit unterschiedlicher Aktivität verwendet werden:

- a) 1 mg Papain desamidiert in 30 Minuten bei 37°C
0,36 10^{-5} Mole α -N-Benzoyl-L-argininamid.HCl.H₂O
- b) 1 mg Papain desamidiert in 30 Minuten bei 37°C
0,754 10^{-5} Mole α -N-Benzoyl-L-argininamid.HCl.H₂O

4.1.10. Bestimmung der Cyclohexanaufnahme

400-600 mg einer genau gewogenen grobstückigen Harzprobe werden 1 Stunde in Cyclohexan aufbewahrt, danach die einzelnen Harzstücke an einem harten Filter abgetupft und in ein gut schließendes Wägegläschen gebracht. Aus der Gewichtszunahme wird die aufgenommene Cyclohexanmenge bestimmt und in mg/ 1g Harz angegeben.

4.2. Nitriertes Copolymerisat aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid

4.2.1. Copolymerisation

1,79 g Methacrylsäure-m-fluoranilid (0,01 Mol),
0,86 g Methacrylsäure (0,01 Mol), 53 mg 50 proz.
Divinylbenzol (1 Gew.%) und 2,6 mg Benzoylperoxid

(0,1 Gew. %) werden in ein Bombenrohr eingewogen. Das Bombenrohr wird in flüssiger Luft abgekühlt und über einen Dreiwegehahn durch wiederholtes Evakuieren mit Hilfe einer Ölpumpe und Spülen mit Stickstoff, sowie durch zweimaliges vorsichtiges Aufschmelzen der Probe unter Stickstoff vollständig von Sauerstoff befreit. Das abgekühlte, evakuierte Bombenrohr wird abgeschmolzen und 48 Stunden bei 75°C und weitere zwei Tage bei 90°C polymerisiert. Das erhaltene Copolymerisat wird zerkleinert, mit Methanol extrahiert, getrocknet, gemahlen und die Fraktion der Korngröße 0,1-0,2 mm Ø ausgesiebt.

Analyse N = 3,94 % F = 5,30 %

Die Analyse entspricht einem Molverhältnis Methacrylsäure zu Methacrylsäure-m-fluoranilid von 2:1.

4.2.2. Nitrierung des Copolymerisates

In ein auf -10°C abgekühltes Nitriergemisch aus 18,9 ml HNO₃ (d = 1,52) und 56,6 ml H₂SO₄ (d = 1,84) werden unter Rühren 2 g des Copolymerisates der Kornfraktion 0,1 - 0,2 mm Ø eingetragen und 6 Stunden gerührt, wobei die Temperatur auf -2°C ansteigt. Das Nitrierungsgemisch wird auf 500 ml Eis gegossen, das Harz abgesaugt, neutralgewaschen und getrocknet. Zur weiteren Reinigung wird das nitrierte Produkt in einer Säule mit Aceton gewaschen. Das stark aufgequollene Harz wird bei Zimmertemperatur getrocknet und nochmals ausgesiebt.

Analyse: N = 3,05 % F = 4,54 %

Das entspricht einem Gehalt von 1,4 Nitrogruppen pro Monomereinheit im Copolymerisat.

4.2.3. Darstellung des Diastaseharzes

2 g des nitrierten Copolymerisates werden mit 6 g Diastase in 150 ml 0,1n NaHCO_3 -Lösung 24 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt und weitere 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Das Enzymharz wird mit 3 l tridest. Wasser gewaschen und vorsichtig bei Zimmertemperatur getrocknet.

4.2.4. Aktivitätsbestimmung des Diastaseharzes

Ca. 100 mg genau gewogenes Diastaseharz werden in einem Zentrifugenglas unter Rühren der in 4.1.4. beschriebenen Aktivitätsbestimmung unterworfen. Nach dem Abzentrifugieren des Harzes wird in einem aliquoten Teil der eingesetzten Stärkelösung die gebildete Maltose bestimmt.

4.2.5. pH-Abhängigkeit der Aktivität des Diastaseharzes

a) Ca. 100 mg Proben genau gewogenen Diastaseharzes werden der Aktivitätsbestimmung nach 4.1.4/4.2.4. unterworfen, wobei der Na-Acetatpuffer pH 6,2 durch Pufferlösungen nach Theorell und Steinhagen der pH-Werte 2,0; 3,3; 4,4; 5,5; 6,2; 7,5; 8,5; 9,4 und 10,0 ersetzt werden. Die Aktivität einer Diastase~~lösung~~ wird unter den gleichen Bedingungen bestimmt.

b) Ca. 100 mg Proben genau gewogenen Diastaseharzes werden 12 Stunden in den oben genannten Pufferlösungen aufbewahrt, danach die Pufferlösungen von den Harzproben mit einer Kapillare abgesaugt und das so behandelte Diastaseharz der in 4.2.4. beschrie-

benen Aktivitätsbestimmung unterworfen.

Zum Vergleich werden 5 ml einer 0,1 proz. Diastase-lösung mit 5 ml der genannten verschiedenen Puffer-lösungen versetzt, 12 Stunden aufbewahrt und mit 1 ml dieser Lösung die Aktivitätsbestimmung nach 4.1.4. durchgeführt.

4.2.6. Darstellung des Cellulaseharzes

Ca. 400 mg genau gewogenes nitriertes Copolymerisat werden mit 20 ml einer 0,1 n NaHCO_3 -haltigen 2 proz. Cellulaselösung 24 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt und weiter 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Das Cellulaseharz wird über eine G2 Fritte abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Die abfiltrierte Enzymlösung und das Waschwasser werden in einem 200 ml Meßkolben gesammelt und 2 ml zur Eiweißbestimmung nach 4.1.1. benutzt. Aus einer vorher ermittelten Eichkurve wird der Eiweißgehalt des Waschwassers abgelesen.

4.2.7. Aktivitätsbestimmung des Cellulaseharzes

Das in 4.2.6. gewonnene Cellulaseharz wird in ein Zentrifugenglas überführt, das überstehende Wasser abgesaugt und unter Rühren der Aktivitätsbestimmung nach 4.1.5. unterworfen, wobei nach dem Abzentrifugieren des Cellulaseharzes ein aliquoter Teil der Reaktionslösung zur Glucosebestimmung entnommen wird.

4.2.8. Darstellung des Trypsinharzes

Ca. 100 mg genau gewogenes nitriertes Copolymerisat werden mit 20 ml einer 0,1 n NaHCO_3 -haltigen 2 proz. Trypsinlösung 24 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt und weitere 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt.

Das Enzymharz wird über eine G2 Fritte abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Zu 5 ml des auf 500 ml aufgefüllten Waschwassers werden 5 ml 0,2 n NaHCO_3 -Lösung gegeben und die Extinktion dieser Lösung bei 270 m μ bestimmt. Aus einer vorher im Bereich von 1 - 10 mg Trypsin ermittelten Eichkurve wird der Eiweißgehalt des Waschwassers abgelesen.

4.2.9. Aktivitätsbestimmung des Trypsinharzes

Das Trypsinharz wird in ein Zentrifugenglas überführt, das überstehende Wasser abgesaugt und unter Rühren die Aktivitätsbestimmung nach 4.1.6. ausgeführt. Zur Bestimmung des gebildeten Tyrosins wird das Enzymharz abzentrifugiert und ein aliquoter Teil der Hämoglobininlösung abpipettiert.

4.2.10. Darstellung des Leucinaminopeptidaseharzes

Ca. 100 mg genau gewogenes nitriertes Copolymerisat werden mit der genau gewogenen ca. doppelten Menge Leucinaminopeptidase und 20 ml 0,1n NaHCO_3 -Lösung versetzt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt und weitere 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Das Enzymharz wird über eine G2 Fritte abfiltriert und mit Wasser gewaschen. In einem ml des auf 250 ml aufgefüllten Waschwassers wird der Eiweißgehalt nach 4.1.2. bestimmt. Aus einer vorher ermittelten Eichkurve wird der Eiweißgehalt des Waschwassers abgelesen.

4.2.11. Aktivitätsbestimmung des Leucinaminopeptidaseharzes

Das Enzymharz wird in ein Zentrifugenglas überführt, das überstehende Wasser abgesaugt und unter Rühren die Aktivitätsbestimmung nach 4.1.7. ausgeführt.

Es werden dabei die doppelten Mengen der angegebenen Lösungen eingesetzt und die Titration der freien Aminosäure in einem nach dem Abzentrifugieren des Harzes abpipettiertem Teil der Reaktionslösung durchgeführt.

4.2.12. Darstellung des Dextranaccharaseharzes

Ca. 100 mg genau gewogenes nitriertes Copolymerisat werden mit 5 ml der Enzymsuspension und 15 ml 0,1 n NaHCO_3 -Lösung bei Zimmertemperatur geschüttelt und weitere 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Das Enzymharz wird mit Wasser gewaschen und der Aktivitätsbestimmung nach 4.1.8. unterworfen.

4.2.13. Darstellung des Papainharzes

Ca. 50 - 300 mg genau gewogenes nitriertes Copolymerisat werden mit 20 ml 0,1 n NaHCO_3 -haltiger 2 proz. Papainlösung 24 Stunden geschüttelt und weitere 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Das Enzymharz wird über G2 Fritten abfiltriert und mit ca. 450 ml Wasser gewaschen. In einem ml des auf 500 ml aufgefüllten Waschwassers wird der Eiweißgehalt nach 4.1.2. bestimmt und aus einer vorher ermittelten Eichkurve der Gehalt des Waschwassers abgelesen.

4.2.14. Aktivitätsbestimmung des Papainharzes

Die in ein Zentrifugenglas überführten Papainharzproben werden vom überstehenden Wasser befreit und unter Rühren der Aktivitätsbestimmung nach 4.1.9. unterworfen. Es werden dabei die doppelten bis vierfachen zur Reaktion eingesetzten Lösungen verwendet und nach dem Abzentrifugieren des Papainharzes ein Teil der Reaktionslösung zur Titration der freien Aminosäure benutzt.

4.2.15. Aktivität des Papainharzes in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit auf das Substrat

Ein aus ca. 150 mg nitriertem Copolymerisat nach 4.2.13. dargestelltes Papainharz wird zweimal der Aktivitätsbestimmung nach 4.2.14. unterworfen, mit Wasser ausgewaschen, vom überstehenden Wasser befreit und mit 2,0 ml 0,1 m Cystein.HCl-Lösung pH 5,1 20 Minuten unter Rühren bei 37°C aktiviert. Danach werden 2 ml des Phosphatpuffers und 20 ml der 4-N-Benzoyl-L-argininamid.HCl.H₂O-Lösung hinzugegeben, sofort 3 ml dieser Reaktionslösung entnommen und als Aktivitätswert zur Zeit 0 nach 4.1.9. titriert. In Zeitabständen von 30 - 60 Minuten werden jeweils weitere 3 ml entnommen und der Gehalt an desamidiertem Substrat bestimmt (Abb. 1).

4.3. Nitrierte Copolymerisate aus Methacrylsäure und Methacrylsäure-m-fluoranilid mit Schwammstruktur

4.3.1. Copolymerisation

In 9 Bombenröhrchen werden je 0,86 g Methacrylsäure (0,01 Mol), 1,79 g Methacrylsäure-m-fluoranilid (0,01 Mol) und 1,33 g (50 Gew.%) Benzin (Kp 150-195°C) eingewogen und mit von 1 - 9 Gew.% ansteigenden Mengen an Divinylbenzol (das verwendete DVB ist etwa 50prozentig) versetzt. Die so vorbereiteten Proben werden in flüssiger Luft abgekühlt, über einen Dreiweghahn durch Evakuieren und Spülen mit Stickstoff, sowie durch zweimaliges Auftauen der Proben unter Vakuum vollständig vom Sauerstoff befreit. Danach werden zu den eingefrorenen Proben je 0,1 Gew.% Benzoylperoxid gegeben, mit 3 Tropfen Benzin nachgespült, die wieder abgekühlten Proben nochmals mit Stickstoff gespült und die evakuierten Bombenröhrchen

abgeschmolzen. Bei 70-80°C werden die Proben 48 Stunden polymerisiert.

4.3.2. Aufarbeitung der Copolymerisate

Die Bombenröhrchen werden nach dem Abkühlen in flüssiger Luft zerschlagen, die zerkleinerten Harze im Vakuumtrockenschrank bei 50°C ausgeheizt und mit Methanol im Soxhlet extrahiert. Die dabei stark aufquellenden Harzproben werden danach solange mit mehrmals erneuertem Petroläther (Kp 50-70°C) extrahiert, bis die Quellung der Harze vollständig zurückgegangen ist (etwa 7-8 Stunden).

Die Copolymerisate werden anschließend im Vakuumtrockenschrank 12 Stunden bei Zimmertemperatur und weiter 12 Stunden bei 50-60°C getrocknet, vorsichtig in einer Reibschale zerkleinert und die Fraktionen der Korngröße 0,1-0,2 mm Ø ausgesiebt.

4.3.3. Nitrierung der Copolymerisate

Je 2 g der Copolymerisate werden nach 4.2.2. nitriert. Die neutral gewaschenen Nitrierungsprodukte werden durch Rühren in zweimal erneuertem Aceton von Abbauprodukten befreit, die stark aufgequollenen Harze abzentrifugiert, das überstehende Aceton vorsichtig abgegossen und die Harze unter Rühren in 100 ml Wasser eingetragen, wobei die Quellung unter Erhalt der Schwammstruktur zurückgeht. Nach dem Absaugen der Harze werden sie zuerst bei Zimmertemperatur über CaCa_2 , danach bei 40-50°C getrocknet und nochmals die Kornfraktionen 0,1-0,2 mm Ø ausgesiebt.

4.3.4. Umsetzung der nitrierten Copolymerisate mit Schwammstruktur mit Papain

Ca. 100 mg genau gewogener Proben werden nach 4.2.13. mit Papain umgesetzt und die Enzymaktivität der

erhaltenen Papainharze nach 4.2.14. bestimmt

4.4. m-Isothiocyanatostyrol-Copolymerisate

4.4.1. Darstellung von m-Aminostyrol (70)

In einer Apparatur, bestehend aus einem 250 ml Destillationskolben mit sich anschließendem Pyrolyserohr, Liebigkühler, gekühlter Vorlage und 2 mit flüssiger Luft gekühlten Kühlfallen, werden 15 g (0,11 Mol) m-Aminophenylmethylcarbinol (Fp 65-66°C) bei 300°C unter Stickstoff an einem sauren AGS-Katalysator der Firma Gebrüder Giulini (Ludwigshafen/Rhl.) im Vakuum pyrolysiert. Die Badtemperatur beträgt 145°C, der Druck 2 mm Hg. Das sich in der Vorlage sammelnde Rohprodukt (10,5 g - 81 % d.Th.) wird unter Zusatz von Hydrochinon unter Stickstoff über eine 10 cm Vigreuxkolonne im Vakuum destilliert. $K_{pO,14}$ 53-54°C, n_D^{20} 1,6092 Ausbeute 8,9 g $\approx$ 68 % d.Th. m-Aminostyrol ist eine farblose Substanz, die sich sehr schnell dunkel färbt.

4.4.2. Darstellung von m-Isothiocyanatostyrol

In einem 500 ml Dreihalskolben mit Rührer und Tropftrichter werden 22,8 g (0,2 Mol) Thiophosgen in 100 ml Chloroform gelöst und mit 50 ml Wasser überschichtet. Unter kräftigem Rühren werden im Verlaufe von 3 Stunden 12 g (0,1 Mol) stabilisiertes m-Aminostyrol hinzugegetropft, wobei durch Zufügen von insgesamt 10,5 (0,1 Mol) festem Na_2CO_3 der pH der Lösung stets zwischen 7 und 8 gehalten wird.

Nach der Zugabe des Amins werden noch weitere 3 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, danach die wässrige Schicht abgetrennt und diese zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformlösungen werden mit Na_2SO_4 getrocknet und im

Wasserstrahlvakuum das thiophosgenhaltige Chloroform abdestilliert. Das mit ter. Butylbrenzkatechin stabilisierte m-Isothiocyantostyrol wird in einer kleinen Destillatinsapparat über eine 10 cm Vigreuxkolonne im Vakuum unter Stickstoff bei einer Badtemperatur von 100°C abdestilliert.

Ausbeute: 15,2 g $\hat{=}$ 95 % d.Th. ; $Kp_{0,1}$ 62°C; n_D^{20} 1,6613

Die charakteristische Isothiocyanatbande liegt von 2010 bis 2130 cm^{-1} .

m-Isothiocyantostyrol ist eine unangenehm riechende Substanz, die sich an der Luft rasch verfärbt. Im Kühlschrank ist es unstabilisiert haltbar.

4.4.3. Copolymerisation des m-Isothiocyantostyrols mit Acrylsäure und Methacrylsäure

Beispiel Harz I: 805 mg frisch destilliertes m-Isothiocyantostyrol ($5 \cdot 10^{-3}$ Mol), 360 mg Acrylsäure ($5 \cdot 10^{-3}$ Mol) 580 mg (50 Gew.%) Benzin (Kp 150-195°C), 23,2 mg 50 proz. DVB (1 Gew.%) und 11,6 mg ABN (1 Gew.%) werden in ein Bombenrohr eingewogen, die Probe nach 4.3.1. vom Luftsauerstoff befreit, abgeschmolzen und 24 Stunden bei 40°C sowie 48 Stunden bei 70°C polymerisiert. Die Aufarbeitung der Copolymerisate erfolgt nach 4.3.2., wobei als Extraktionsmittel nicht Methanol sondern Aceton verwendet wird.

4.4.4. Darstellung des Acrylsäureesters des Diäthylenglykolmonomethyläthers (71)

In einem 250 ml Dreihalskolben mit Gaseinleitung, Thermometer und einer 15 cm Vigreuxkolonne werden 47,2 g (0,3 Mol) Diäthylenglykolmonomethyläther, 54 g Acrylsäureäthylester (0,6 Mol) 2 g Hydrochinon und 1 g p-Toluolsulfonsäure unter Stickstoffeinleitung auf 90-100°C erhitzt, wobei das

Aceotrop aus Acrylsäureäthylester und Äthylalkohol bis zu einer Siedetemperatur von $77-78^{\circ}\text{C}$ abdestilliert wird. Der Acrylsäureester des Diäthylenglykolmonomethyläthers wird in einer kleinen Destillationsapparatur unter Zusatz von Hydrochinon über eine 10 cm Vigreuxkolonne unter Stickstoff im Vakuum destilliert.

Ausbeute 31 g $\hat{=}$ 60 % d.Th.; Kp_5 $87-89^{\circ}\text{C}$; n_D^{20} 1,4378

4.4.5. Copolymerisation des Acrylsäureesters des Diäthylenglykolmonomethyläthers mit m-Isothiocyantostyrol

805 mg m-Isothiocyantostyrol ($5 \cdot 10^{-3}$ Mol), 870 mg des Esters ($5 \cdot 10^{-3}$ Mol), 1675 mg (50 Gew.%) Benzin (Kp $150-195^{\circ}\text{C}$) 335 mg 50 proz. DVB (10 Gew.%) und 3,2 mg ABN (0,2 Gew.%) werden in ein Bombenrohr eingewogen, nach 4.3.1. vom Sauerstoff befreit und 24 Stunden bei 35°C sowie weitere 48 Stunden bei 70°C polymerisiert. Das Copolymerisat wird zerkleinert, 2 Tage mit Äther, einen Tag mit Aceton und einen weiteren Tag mit Äther extrahiert. Nach dem Trocknen bei Zimmertemperatur wird das Copolymerisat im Mörser zerkleinert und die Fraktion 0,1-0,2 mm ϕ ausgesiebt.

4.5. Vinylisothiocyant-Copolymerisate

4.5.1. β -Bromäthylisothiocyant

In einem 1 l Dreihalskolben mit Rührer und Tropftrichter werden 34 g Thiophosgen (0,3 Mol) in 200 ml Chloroform gelöst und 100 ml H_2O hinzugegeben. Im Verlaufe von 3 Stunden werden 40 g β -Bromäthylamin. HBr (0,2 Mol) (72) in 150 ml H_2O gelöst eingetropft, wobei der pH-Wert der wässrigen Phase unter Hinzufügen von insgesamt 22 g Na_2CO_3 stets zwischen

7 und 8 gehalten wird. Nach der Zugabe des Amins werden noch weitere 3 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, danach die wässrige Phase abgetrennt, diese zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt und die vereinigten Chloroformlösungen mit Na_2SO_4 getrocknet.

Nach dem Abdestillieren des thiophosgenhaltigen Chloroforms wird das β -Bromäthylisothiocyanat fraktioniert destilliert.

Ausbeute 26,6 g = 80 % d.Th.; Kp_{25} 105-110°C (52)

4.5.2. Vinylisothiocyanat

20,2 g (0,2 Mol) getrocknetes Triäthylamin werden in einem 250 ml Dreihalskolben mit Rührer, Thermometer, Tropftrichter und Rückflußkühler auf 40-50°C erwärmt und unter Rühren 32,2 g (0,2 Mol) β -Bromäthylisothiocyanat so eingetropft, daß die Temperatur der fest werdenden Mischung nicht über 55°C ansteigt. Nach der Zugabe des Isothiocyanates werden 50 ml trockener Äther hinzugegeben und unter Rühren 2 Stunden am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Äther abgetrennt, die feste Phase noch mehrmals mit trockenem Äther gewaschen und dieser bei einer Badtemperatur von 40°C unter Normaldruck abdestilliert. Der dunkel gefärbte Rückstand wird bei 150 mm Hg unter Stickstoff fraktioniert.

Ausbeute 10,5 g $\pm$ 61 % d.Th.; Kp_{150} 56-58°C;
 n_D^{35} 1,5605

Vinylisothiocyanat ist eine stechend riechende, zu Tränen reizende, schwach gelb gefärbte Substanz.

4.5.3. Copolymerisation von Vinylisothiocyanat mit Acrylsäure und Methacrylsäure

Beispiel Harz VIII: In einem Bombenrohr werden 850 mg (0,01 Mol) Vinylisothiocyanat, 720 mg (0,01 Mol) Acrylsäure, 785 mg (50 Gew.%) Benzin (Kp 150-195°C), 31,4 mg 50 proz. DVB (1 Gew.%) und 3,1 mg ABN (0,2 Gew.%) eingewogen, nach 4.3.1. vom Sauerstoff befreit und 24 Stunden bei 40°C sowie 48 Stunden bei 70°C polymerisiert.

Die Aufarbeitung des Copolymerisates erfolgt nach 4.3.2., wobei als Extraktionsmittel statt Methanol Aceton verwendet wird.

4.6. Isothiocyanato-Lewatit (Harz X)

3 g des gemahlenden Lewatit CA 9119 der Korngröße 0,1-0,2 mm Ø werden in einem 250 ml Zweihalskolben mit Rührer in 100 ml Chloroform suspendiert und mit 50 ml H₂O versetzt. Nach Zugabe von 10 g Thiophosgen werden 12 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, wobei der pH-Wert der wässrigen Phase durch Zusatz von festem Na₂CO₃ stets zwischen 7 und 8 gehalten wird. Das gewonnene Isothiocyanatharz wird mit Aceton gewaschen und elektrodialysiert.

4.7. Sulfontiertes Polyisothiocyanatostyrol (Harz XI)

4.7.1. Chlorsulfonierung des Polystyrols (73)

20 g (0,2 Mol) Polystyrol (200-400 mesh, 2 % DVB) werden in 140 ml Dichloräthan 1 Stunde gequollen und unter kräftigem Rühren 66 g (0,6 Mol) Chlorsulfonsäure eingetropft. Die Reaktionstemperatur wird bei 20°C gehalten. Nach 5stündigem Rühren wird das Harz abgesaugt, mit Dichloräthan mehrmals gewaschen und solange bei 60°C in 100 ml Wasser gerührt, bis das

Säurechlorid vollständig verseift ist (etwa 8 Stunden). Aus der Austauschkapazität ergibt sich ein 50prozentiger Umsatz zu Polystyrolsulfonsäure.

4.7.2. Nitrierung des sulfonierten Polystyrols

20 g des sulfonierten Polystyrols werden nach 4.2.2. nitriert.

Analyse: C = 39,83 %, H = 3,35 %, N = 8,21 %, S = 6,41 %

Es errechnet sich ein Gehalt von 0,5 Mol-SO₃H und 1,5 Mol-NO₂ pro Styroleinheit des Polymeren.

4.7.3. Reduktion des sulfonierten, nitrierten Polystyrols (30)

10 g des Produktes aus 4.7.2. werden mit 200 ml 2,5 n NaOH und 40 g Na₂S₂O₄ 2 Stunden bei 65°C gerührt, danach nochmals 40 g Na₂S₂O₄ und 30 ml 0,5 n NaOH hinzugefügt und weitere 3 Stunden bei 65°C gerührt. Das reduzierte Harz wird mit Wasser, 0,1 n HCl, nochmals mit Wasser gewaschen und elektrodialysiert.

4.7.4. Umsetzung zum Isothiocyanat

10 g des Polyaminostyrols aus 4.7.3. werden nach 4.6. mit Thiophosgen umgesetzt und das gewonnene Isothiocyanat elektrodialysiert.

4.8. Isothiocyanate aus m-Aminostyrol-Copolymerisaten

4.8.1. Copolymerisation von m-Aminostyrol mit Methacrylsäure

In einem Bombenrohr werden 1,19 g (0,01 Mol) frisch destilliertes m-Aminostyrol, 0,86 g (0,01 Mol) Methacrylsäure, 1,023 g (50 Gew.%) Benzin (Kp 150-195°C), 41 mg 50 proz. DVB (1 Gew.%) und 4,1 mg ABN (0,2 Gew.%)

eingewogen, nach 4.3.1. vom Sauerstoff befreit und 24 Stunden bei 50°C und weitere 48 Stunden bei 70°C polymerisiert. Das erhaltene Schwammpolymere wird nach 4.3.2. extrahiert sowie 8 Stunden mit 0,1 n NaOH bei 60°C gerührt.

4.8.2. Umsetzung zum Isothiocyanat

2 g des aus 4.8.1. erhaltenen Copolymerisates wird nach 4.6. mit Thiophosgen umgesetzt und das erhaltene Isothiocyanatharz elektrodialysiert.

4.9. Polyvinylisothiocyanat

4.9.1. Darstellung von Polyvinylamin

5 g nach Houben Weyl Band XIV S.1019 polymerisierte Acrylsäure der Viskositätszahl 1600 cm³/g ($c = 1,5 \cdot 10^{-3}$ g/cm³, $t = 25^\circ\text{C}$) werden in 110 ml konz. H₂SO₄ bei 40°C unter Rühren vollständig gelöst, mit 15 ml trockenem Benzol versetzt und unter weiterem Rühren langsam 70 ml einer benzolischen Lösung von N₃H (0,11 g N₃H pro 1 ml) eingetropft. Der sich entwickelnde Stickstoff wird über eine 20 proz. KOH enthaltende Waschflasche in den Abzug geleitet. Nach 4 Stunden wird die Reaktion abgebrochen und die Lösung nach dem Abkühlen in die 5fache Menge Methanol eingerührt. Das Polyvinylsulfat fällt als weiße Substanz an.

Ausbeute 3 g

Durch mehrmaliges Lösen des Sulfates in 1n HCl und Fällern in Methanol wird das Sulfat in das Chlorid überführt.

Viskositätszahl: 1000 cm³/g ($c = 1,5 \cdot 10^{-2}$ g/cm³, $t = 25^\circ\text{C}$)

4.9.2. Umsetzung zum Isothiocyanat

In einem 2 l Dreihalskolben mit Tropftrichter und Rührer werden 20 g Thiophosgen in 400 ml Chloroform gelöst und unter kräftigem Rühren 8 g in 200 ml Wasser gelöstes Polyvinylamin-HCl innerhalb von 4 Stunden eingetropft. Mit festem Na_2CO_3 wird der pH-Wert der wässrigen Phase zwischen 7 und 8 gehalten. Es bildet sich eine gallertige gelb gefärbte Suspension aus, die noch weitere 4 Stunden gerührt wird. Das unlösliche Isothiocyanat wird abgesaugt, mit Wasser und Aceton gewaschen und elektrodialysiert.

4.10. Umsetzungen an den polymeren Isothiocyanaten

4.10.1. Umsetzungen mit n-Butylamin

50 - 100 mg Proben der genau gewogenen Isothiocyanatharze werden mit 20 ml 0,1n n-Butylaminlösung versetzt und 3 Tage in gut verschlossenen Erlenmeyerkolben bei Zimmertemperatur geschüttelt. Danach werden die Suspensionen mit 50 ml Wasser verdünnt und mit 0,1n NaOH gegen einen Mischindikator (pH 7) das überschüssige n-Butylamin zurücktitriert. Ein Blindwert wird bestimmt.

4.10.2. Umsetzungen mit Leucinamid.HCl

50 - 100 mg der genau gewogenen Isothiocyanatharzproben werden mit ca. 300 mg genau gewogenem Leucinamid.HCl und 20 ml 1n NaHCO_3 - oder 0,1n Na_2CO_3 -Lösung versetzt und 3 Tage bei Zimmertemperatur geschüttelt. Über G2 Fritten werden die Harze danach abfiltriert und mit Wassergewaschen. In 25 ml des auf 100 ml aufgefüllten Waschwassers wird der N-Gehalt nach Kjeldahl bestimmt. Ein Blindwert wird bestimmt.

4.10.3. Umsetzungen des Harzes II mit Di- und Tripeptiden

Ca. 50 mg genau gewogener Proben des Harzes II werden mit 200 mg der Peptide und 20 ml 1n NaHCO_3 -Lösung 3 Tage bei Zimmertemperatur geschüttelt, die Harzproben über G2 Fritten in 250 ml Meßkolben abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Waschwasser der jeweilige Peptidgehalt UV-spektroskopisch bestimmt. Dazu werden die Lösungen 1 : 100 mit 0,1 n NaOH verdünnt und die Extinktion der Tyrosin enthaltenden Peptidlösungen bei $290 \text{ m}\mu$, die der Phenylalanin enthaltenden Peptidlösungen bei $254 \text{ m}\mu$ gemessen.

Die Harzproben werden quantitativ in 50 ml Rundkolben überführt, am Rotationsverdampfer getrocknet, mit 30ml bei Zimmertemperatur mit HCl gesättigtem Eisessig versetzt und 8 Stunden unter Feuchtigkeitsausschluß auf 60°C erwärmt. Danach wird der Eisessig am Rotationsverdampfer abgezogen, die Harzproben mit Wasser auf kleinen Filtern ausgewaschen und in den in 100 ml Meßkolben aufgefangenen Waschwassern der Gehalt an Aminosäuren bzw. an Dipeptiden, wie oben beschrieben, UV-spektroskopisch bestimmt. Die Abspaltung mit HCl-Eisessig wird wiederholt. Nach der 2. Abspaltung mit HCl-Eisessig werden die Harzproben getrocknet und möglichst vollständig mit konz.HCl in Bombenrohre überführt, worin sie 2 Tage auf 150°C erhitzt werden. Die Salzsäurelösungen werden danach dünnschichtchromatographisch untersucht.

4.10.4. Umsetzungen mit Papain

50 - 100 mg genau gewogener Isothiocyanatharzproben werden 3 Tage bei Zimmertemperatur mit 20 ml 1n NaHCO_3 -enthaltender 2 proz. Papainlösungen geschüttelt, über G2Fritten abfiltriert, mit Wasser gewaschen und

der Aktivitätsbestimmung nach 4.2.14 unterworfen. Im Waschwasser wird der Eiweißgehalt nach 4.1.2. bestimmt.

4.10.5. Aktivität der Papainharze in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer auf das Substrat

Nach 4.2.15. wird die Zeitabhängigkeit der Papainaktivität bestimmt, wobei die verwendeten Lösungen auf 7 ml Cysteinlösung, 14 ml Pufferlösung und 56 ml Substratlösung erhöht werden.

4.10.6. Umsetzungen mit Lactalbumin

Ca. 100 mg der genau gewogenen Harzproben werden mit 10 ml 1n NaHCO_3 - oder 0,1n Na_2CO_3 -haltigen 2 proz. Lactalbuminlösungen 3 Tage bei Zimmertemperatur geschüttelt, abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Waschwasser der Eiweißgehalt nach 4.1.2. bestimmt.

4.10.7. Umsetzungen mit Proteinen

100 mg Proben der Isothiocyanatharze III und VI werden nach 4.1.5. mit Salmin, Myoglobin, Ovalbumin und Serumalbumin umgesetzt. Der Eiweißgehalt der Waschwasser wird mit Ausnahme des Salmins, das nach 4.1.3. bestimmt wird, nach 4.1.2. gemessen.

4.11. Vernetztes Papain

5 ml einer 40%igen Lösung des nach der allgemeinen Vorschrift nach Houben/Weyl 'Methoden der organ.Chemie, Bd. IX 877', dargestellten Isothiocyanates aus 2.2'-Benzidindisulfonsäure wurden mit 3 ml 0,1n NaHCO_3 -Lösung und 2 ml einer 50%igen Papainlösung versetzt und nach einem Tag Aufbewahrung bei Zimmertemperatur der ausgefallene Niederschlag abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und der Aktivitätsbestimmung nach 4.2.14. unterworfen. An parallel dargestellten Proben wurde die Gewichtsausbeute bestimmt. Sie betrug 30 mg bzw. 37 mg.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. R.B.MERRIFIELD, Federation Proc. 21 412 (1963)
Science 150 178 (1965)
2. R.L.LETSINGER, J.Am.Chem.Soc. 85 3045 (1963)
86 5163 (1964)
3. R.L.LAURENSEN, J.Am.Chem.Soc. 88 5344 (1966)
4. A.SCHELLENBERGER, H.JESCHKEIT, R.HENKEL,
M.LEHMANN Z.f.Chemie 7 191 (1967)
5. G.MANECKE Naturw. 51 25 (1964)
6. H.I.SILMAN, E.KATCHALSKI Ann.Rew.Biochem.
35 873 (1966)
7. L.H.KENT, J.H.R.SLADE BP 993 961 (1965)
8. M.A.MITZ, L.J.SUMMARIA Nature 189 576 (1961)
9. C.J.EPSTEIN, C.B.ANFINSEN J.Biol.Chem.
237 2175 (1962)
10. A.PATCHORNIK Israel Pat. 18207 (1962)
11. A.BAR-ELI, E.KATCHALSKI
J.Biol.Chem. 238 1960 (1963)
Nature 188 856 (1960)
12. M-LILLY, C.MONEY, W.HORNBY, E.M.CROOK
Biochem.J. 95 45P (1965)
13. H.I.SILMAN, M.ALBU WEISENBERG, E.KATCHALSKI
Biopolym. 4 441 (1966)
14. G.MANECKE, H.J.FÖRSTER Makromol.Chem.
91 136 (1966)
15. N.GRUBHOFFER, L.SCHLEITH Z.Physiol.Chem.
(Hoppe Seyler's) 297 108 (1954)
16. G.MANECKE, G.GÜNZEL Makromol.Chem.
51 199 (1962)
17. A.RIMON, M.GUTMAN, S.RIMON Biochim.Biophys.Acta
73 301 (1963)
18. M.GUTMAN, A.RIMON Can.J.Biochem.42 1339 (1964)
19. H.I.SILMAN, D.WELINER, E.KATCHALSKI
Israel J.Chem. 1 65 (1963)

20. E.RIESEL, E.KATCHALSKI
J.Biol.Chem. 239 1521 (1964)
21. G.MANECKE, S.SINGER
Makromol. Chem. 39 13 (1960)
22. A.E.SEHON Pure appl.Chem. 4 483 (1962)
23. D.N.KURSANOW, P.A.SOLODKOW
J.angew. Chem(UdSSR) 16 351 (1943)
24. A.E.GURVICH, R.B.KOPNER, R.S.NESLIN
Biokhimiya (UdSSR) 24 144 (1959)
25. A.E.GURVICH Biokhimiya (UdSSR) 22 1028 (1957)
26. R.S.NESLIN Biokhimiya (UdSSR) 24 521 (1959)
27. D.H.CAMPBELL, E.L.LUESCHER, L.S.LERMAN
Proc.nat. Acad.Sci. USA 37 575 (1951)
28. A.MALLEY, D.H.CAMPBELL
J.Am.Chem.Soc. 85 487 (1963)
29. O.W.TAIMAGE, H.R.BAKER, W.AKESON
J.infec. Diseases 94 199 (1954)
30. R.AXEN, J.PORATH Nature 210 367 (1966)
31. H.L. ISLIKER Adv.Protein Chem. 12 387 (1957)
Ann. N.Y.Acad.Sci. 57 255 (1953)
32. G.MANECKE, K.E.GILLERT Naturw. 42 212 (1955)
33. L.GYENES, B.ROSE, A.H.SEHON
Canad.J.Biochem. Physiol. 38 1235 (1960)
34. G.B.BACHMANN et.al. J.org.Chem. 12 108 (1947)
35. H.BRANDENBERGER Angew. Chem. 67 661 (1955)
36. G.MANECKE, S.SINGER, K.E.GILLERT
Naturw. 47 63 (1960)
37. G.MANECKE, S.SINGER
Makromol. Chem. 37 119 (1960)
38. J.J.CEBRA, D.GIVOL, H.I.SILMAN, E.KATCHALSKI
J.Biol.Chem. 236 1720 (1961)
39. P.EDMAN Acta Chem.Scand. 4 277 (1950)
40. Y.LEVIN, M.PECHT, L.GOLDSTEIN, E.KATCHALSKI
Biochem. 3 1905 (1964)

41. R.WILLSTÄTTER, E.WALDSCHMIDT-LEITZ, A.R.F.HESSE
Z.physiol.Chem. (Hoppe Seyler's) 126 143 (1923)
42. E.T.REESE, R.G.H.SIU, H.D.LEVINSON
J. Bacteriol. 59 485 (1950)
43. M.J.WOLF, V.JURKOVICH, M.M.MAC MASTERS
Arch.Biochem.Biophys. 81 15 (1959)
44. A.N.GLAZER, A.BAR-ELI, E.KATCHALSKI
J.Biol. Chem. 237 1832 (1962)
45. N.M.GREEN, H.NEURATH
The Proteins Vol II Part B 1057
46. J.R.KIMMEL, E.L.SMITH
Adv. Enzymologie XIX 267
47. E.L.SMITH, A.STOCKEL, J.R.KIMMEL
J.Biol. Chem. 207 551 (1954)
48. J.R.MILLAR, G.D.SMITH, T.R.E.KRESSMAN
J.chem.Soc. (London) 304 (1965)
49. H.CORTE, A.MEYER DBP 1.045.102 (1965)
J.MILLAR USP 849.122 (1958)
50. R.F.STEINER, H.EDELHOCH Chem.rew. 62 457 (1962)
51. R.C.SCHULZ, R.STENNER
Makromol.Chem. 72 202 (1964)
52. G.D.JONES, R.J.ZIMMERMANN USP 2.757.190 (1956)
53. G.G.OVERBERGER, H.A.FRIEDMAN
J.Polym.Sci. Part. A3 3625 (1965)
54. C.R.STARK Federation Proc. 24 225 (1965)
55. P.KARLSON Kurzes Lehrbuch der Biochemie
56. H.RATH, E.HILSCHER DBP Auslegungsschrift
1.153.528 (1963)
57. G.R.TRISTAM, R.H.SMITH
Adv.Protein Chem. 18 227 (1963)
58. F.WOLD J.Biol. Chem. 236 106 (1961)
H.ZAHN, H.PFANNMÜLLER Biochem.Z. 330 97 (1958)
59. R.R.A.COMBS, A.N.HOWARD, F.WILD
Bacteriol.J.Exptl. Pathol. 33 390 (1952)
E.R.ARQUILLA, A.B.STARITSKY
J.Clin.Invest. 35 458 (1956)
E.R.ARQUILLA, C.COBLANCE
Anat. Record. 138 203 (1960)

60. H.ZAHN, O.WASCHKA Makromol.Chem. 18/19 201 (1955)
61. J.E.MOORE, W.H.WARD
J.Am.Chem.Soc. 78 2414 (1956)
62. D.J.HERZIG, A.W.REES, R.A.DAY
Biopolymers 2 349 (1964)
63. D.PRESSMANN Ind.Eng.Chem. 15 357 (1943)
64. O.H.LOWRY, N.J.ROSERBROUGH, A.R.FARR, R.J.RANDOLL
J.Biol.Chem. 193 265 (1951)
65. A.G.GORNALL, C.S.BARDAWILL, M.M.DAVID
J.Biol.Chem. 177 751 (1949)
66. M.SOMOGYI J.Biol.Chem. 160 61 (1945)
67. M.L.ANSON J.Gen.Physiol. 22 79 (1938)
68. R.L.HILL, D.H.SPACMAN
Biochem.Prep. 6 35 (1958)
69. W.BROOK-NEELY J.Am.Chem.Soc. 80 2010 (1958)
70. G.W.EIGENMANN Dissertation Univ.of Missouri 1957
71. Org. Synthesis
C.E.REHBERG, W.A.FAUCETTE 26 18
J.organ.Chem. 14 1094 (1949)
72. Org.Synthesis Vol I 91 (1946)
73. JESSE C.H.HWA USP 2 891 916 (1956)
74. J.D'ANS und E.LAX Taschenbuch für Chemiker
und Physiker

L e b e n s l a u f

Am 4. Dezember 1934 wurde ich, Gudrun Günzel geb. HeiBrath, als zweites Kind des Gärtners Helmut HeiBrath und seiner Ehefrau Margarete geb. Hübner in Grünberg/Schlesien geboren, wo ich 1941 eingeschult wurde. In Halle/Saale beendete ich 1949 die Grundschulausbildung, besuchte anschließend die Oberschule und legte 1953 die Reifeprüfung ab.

Im Herbst 1953 begann ich an der Technischen Hochschule Dresden mit dem Chemiestudium, setzte dieses ab 1958 an der Freien Universität Berlin fort und bestand am 5.5.1961 die Diplomprüfung in Chemie. Von 1961 bis 1964 war ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Herrn Prof.Dr.G. Manecke im Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft angestellt. Seit dem 1.10.1964 bin ich wissenschaftliche Assistentin im Organisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin, wo ich die vorliegende Dissertation anfertigte.

